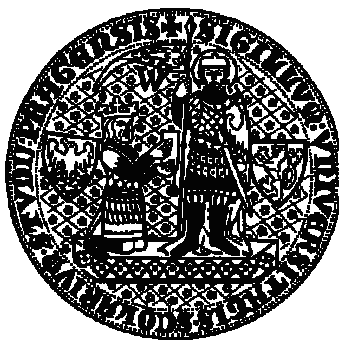


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Buněčná a vývojová biologie
Vývojová biologie



Bc. Eva Žatecká

**Vliv tetrabrombisfenolu A (TBBPA) na reprodukční
parametry, spermatogenezi a aktivitu vybraných genů u
myší *in vivo*.**

Influence of tetrabromobisphenol A (TBBPA) on reproduction
parameters, spermatogenesis and expression of selected genes in
mice *in vivo*.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitelka: doc. RNDr. Jana Pěkníková, CSc

Praha 2011

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 27.7.2011

.....

Podpis

Poděkování:

Velmi ráda bych poděkovala všem, kteří mi pomáhali při vzniku této práce. Především doc. RNDr. Janě Pěkníkové, Csc za cenné informace a trpělivé vedení mé práce, Mgr. Lukáši Dědovi za množství praktických rad při provádění a hodnocení experimentů, dále pak Ing. Aleně Kubátové za pomoc při pochopení metod nezbytných k dosažení výsledků a celému kolektivu naší skupiny za podporu a cenné připomínky a rady.

V neposlední řadě bych chtěla vyjádřit svůj vděk mé rodině za poskytnutou podporu a zázemí během mého studia.

Abstrakt:

Tetrabrombisfenol A je látka, které je využívána v průmyslu jako zpomalovač hoření. V současné době patří k těm nejpoužívanějším, jeho spotřeba činí 210 000 tun/rok a stále roste. Bylo prokázáno, že TBBPA se může uvolňovat do prostředí, byl nalezen v životním prostředí a dokonce i v lidském těle. Byly prokázány negativní účinky TBBPA na různé buněčné linie *in vitro* včetně TM4 Sertoliho buněk. Dále bylo prokázáno, že je schopen ovlivnit thyroidní hormonální systém a předpokládá se, že by mohl být schopen ovlivnit i androgení/estrogení hormonální systém. Z těchto důvodů byl TBBPA zařazen na seznam látek potencionálně nebezpečných lidskému zdraví. V této studii byl studován vliv TBBPA na reprodukční parametry, spermatogenezi a aktivitu vybraných genů na myších *in vivo*. Nejprve byla provedena dvougенераční studie na outbrední myší linii – CD1. U experimentálních zvířat byl detekován zvýšený počet apoptotických buněk v testes a dále byla zjištěna změna exprese u genů kódujících vybrané proteiny, které hrají důležitou roli během spermatogeneze. Naproti tomu kvalita spermií a reprodukceschopnost myší ovlivněných látkou TBBPA ovlivněny nebyly. Jako dodatková studie byla provedena jednogenerační *in vivo* studie na inbrední myší linii – C57BL/6. Tato studie převážně potvrdila výsledky obdržené z předešlé CD1 *in vivo* studie.

Klíčová slova:

Tetrabrombisfenol A, reprodukce, reprodukční parametry, spermatogeneze, apoptosa, genová exprese

Abstract:

Tetrabromobisphenol A is a substance that is widely used in industry as a fire retardant and is currently among the most widely used; its consumption is 210,000 tons / year and is still growing. It was shown that TBBPA can be released into the environment and it was found even in the human body. TBBPA has negative effects on different cell lines *in vitro*, including TM4 Sertoli cells. It was shown that it can affect the thyroid hormone system as well it might be able to influence the androgen / estrogen hormone system. Due to these facts, TBBPA was added to the list of potentially dangerous substances to human health. In this study, the effect of TBBPA on the reproductive parameters, spermatogenesis and activity of selected genes in mice *in vivo* was examined. First, we perform two generation *in vivo* study with outbred mouse line - CD1. In experimental animals we detected increased number of apoptotic cells in the testes, and also we observed changes in the expression pattern of selected genes encoding proteins that play an important role during spermatogenesis. In contrast, sperm quality and reproduction was not affected by TBBPA. As a complementary study was perform one generational *in vivo* study with inbred mouse line - C57BL/6. This study mostly confirmed the results obtained from previous *in vivo* study.

Key words:

Tetrabromobisphenol A, reproduction, reproduction parameters, spermatogenesis, apoptosis, gene expression

Obsah:

Abstrakt	4
Abstract	5
Seznam zkratek	9
1 Úvod	11
1.1 Fyziologie reprodukce	11
1.1.1 Spermie	11
1.1.2 Spermatogeneze	14
1.1.2.1 Genová exprese v samčích zárodečných buňkách	15
1.1.2.2 Exprese vybraných Heat shock proteinů během spermatogeneze	16
1.1.2.2.1 Spermatid-specific Heat shock protein 70 (Hsc70t)	17
1.1.2.2.2 Heat shock protein 70-2 (Hsp70-2)	17
1.1.2.2.3 Heat shock protein 60 (Hsp60)	20
1.1.2.2.4 Heat shock protein Apg-1	21
1.1.3 Apoptosa zárodečných buněk v testes	21
1.1.3.1 Průběh apoptosy v savčích buňkách	23
1.1.3.2 Strukturální rysy buněčné smrti způsobené apoptosou	26
1.1.4 Post-testikulární maturace.....	26
1.1.5 Oplození	27
1.2 Patologie lidské reprodukce	29
1.2.1 Polutanty životního prostředí	31
1.2.1.1 Bromované zpomalovače hoření	31
1.2.1.2 Tetrabrombisfenol A (TBBPA)	32
1.3 Reprodukčně-toxikologické studie na myším modelu <i>in vivo</i>	34
1.4 Patologie samčí reprodukce po ovlivnění polutanty	35

2 Cíle práce	37
3 Metody	38
3.1 Použité chemikálie a roztoky	38
3.2 Studie <i>in vivo</i>	39
3.3 Váha těla a orgánů	40
3.4 Příprava buněk	41
3.5 Koncentrace spermií	41
3.6 Určení životnosti spermií	42
3.7 Hodnocení apoptotického stavu spermií	42
3.8 Morfologie spermií	42
3.9 Nepřímá imunofluorescence	43
3.10 Příprava buněčných suspenzí	43
3.11 Histologie	44
3.12 TUNEL analýza na histologických řezech testes	44
3.13 Detekce genové exprese	45
3.13.1 Izolace RNA	46
3.13.2 Stanovení celkového množství RNA	46
3.13.3 Reverzní transkripce (syntéza cDNA)	47
3.13.4 Real Time PCR (RT PCR)	47
3.14 Imunodetekce vybraných Heat shock proteinů	49
3.14.1 Izolace proteinů	49
3.14.2 Měření koncentrace proteinů	50
3.14.3 Proteinová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	50
3.14.4 Barvení gelů pomocí Coomassie blue	51
3.14.5 Přenos proteinů na PVDF membránu	51

3.14.6 Imunodetekce pomocí specifických protilátek	51
3.14.7 Kvantifikace detekovaných proteinů	52
3.15 Stanovení aktivity enzymu Kaspasa 3	53
3.16 Stanovení množství apoptotických buněk pomocí průtokové cytometrie	54
3.17 Statistická analýza	56
4 Výsledky	57
4.1 Výsledky <i>in vivo</i> studie provedené na CD1 myších	57
4.1.1 Počet potomků, váha těla a orgánů	57
4.1.2 Parametry spermií	58
4.1.3 Histologie	59
4.1.4 TUNEL analýza	60
4.1.5 Genetická analýza (CD1 <i>in vivo</i> studie)	61
4.1.6 Imunodetekce vybraných Heat shock proteinů	65
4.2 Výsledky <i>in vivo</i> studie provedené na C57BL/6 myších	69
4.2.1 Váha těla a orgánů	69
4.2.2 Určení množství apoptotických buněk v testikulární buněčné suspenzi na průtokovém cytometru (TUNEL analýza)	69
4.2.3 Aktivita enzymu Kaspasa 3	71
4.2.4 Genetická analýza (BL/6 <i>in vivo</i> studie)	71
4.2.5 Korelace dat získaných z Caspase 3 assay a Real Time PCR provedeného s primery pro geny Bax a Bcl-2.....	75
5 Diskuze	77
6 Závěr	86
7 Literatura	87

Seznam zkratek

A1	- Bcl2-related protein	GH3 buňky	- buněčná linie odvozená z krysích hypofyzárních buněk
Acr	- preacrosin		
Apaf-1	- apoptotic protease factor	HBCD	- hexabromcyklododekan
Apg-1	- ATP and peptide binding protein in germ cells	Hsc70t	- heat shock 70 kDa protein 1-like
APS	- persíran amonný	HSF1	- heat shock transkripční faktor
Ar	- androgení receptor	Hsp	- heat shock protein
ATP	- adenosintrifosfát	Hsp110	- rodina heat shock proteinů o molekulové hmotnosti 110 kDa
Bad	- Bcl2-associated agonist of cell death	Hsp60	- heat shock protein o molekulové hmotnosti 60kDa
Bak	- Bcl2-antagonist/killer	Hsp70-2	- heat shock protein 70-2
Bax	- Bcl2-associated X protein	MCF-7 buňky	- buněčná linie odvozená z buněk karcinomu prsu
Bcl-2	- B-cell leukemia/lymphoma	Mcl-1	- myeloid cell leukemia sequence 1
BSA	- hovězí sérový albumin	M fáze	- mitotická fáze buněčného cyklu
CDC2	- cyklyn dependentní protein kináza 2	MPF	- maturation promoting factor
cDNA	- komplementární deoxynukleová kyselina	mRNA	- mediátorová ribonukleová kyselina
DAPI	- 4', 6-diamino-2-fenylindolyl	NK buňky	- buňky imunitního systému (Natural killer cell)
DNA	- deoxyribonukleová kyselina	p53	- tumor supresorový gen
dUTP	- deoxyuridine trifosfát	PBB	- polybromovaný biphenyl
EDTA	- ethylenediamin tetraoctová kyselina	PBDE	- polybromovaný biphenyl ether
FADD	- Fas associated death domain		
G fáze	- růstová fáze buněčného cyklu		

PBS	- fosfátový pufr (fyziologický roztok)
PCR	- polymerázová řetězová reakce
PVDF membrána	- polyvinylidenfluoridová kyselina
RNA	- ribonukleová kyselina
RT-PCR	- polymerázová řetězová reakce v reálném čase
S fáze	- syntetická fáze buněčného cyklu
SDS	- dodecylsulfát sodný
T4	- thyroxin
TBBPA	- tetrabrombisfenol A
Tdt	- terminální deoxynukleotidyl transferáza
TEMED	- N,N,N', N'-tetramethylendiamin
TH receptor	- thyroidní receptor
TM4 Sertoliho buňky	- buněčná linie pocházející z prepubertálních testes BALB/c myši
Tris	- tris (hydroxymethyl) aminomethan
TTR	- transthyretin
TUNEL assay	- TdT-mediated dUTP nick-end labelling assay
ZP	- zona pellucida
ZP2	- zona pellucida sperm-binding protein 2
ZP3	- zona pellucida sperm-binding protein 3

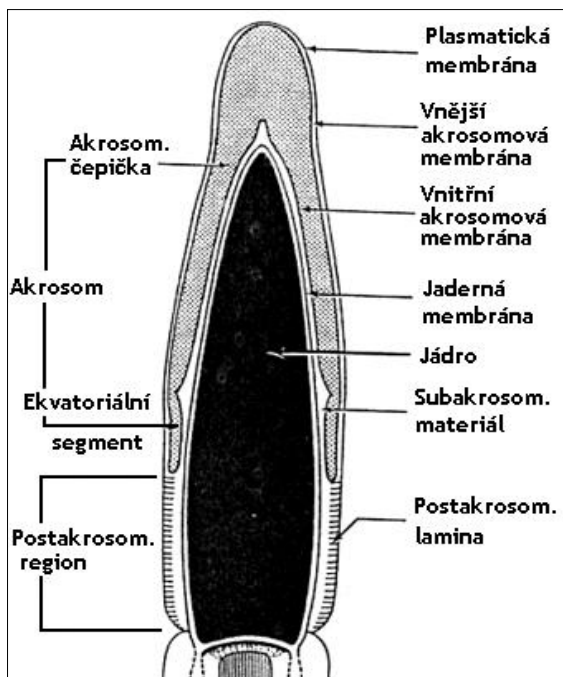
1 Úvod

Oplození je unikátní děj, při kterém dochází ke splynutí dvou haploidních pohlavních buněk – gamet. Tímto splynutím vzniká diploidní zygota, ze které se vyvíjí budoucí embryo. Tento děj, označovaný také jako jeden z největších zázraků přírody, je velmi křehký a v dnešní době existuje mnoho faktorů, které ho mohou narušit. Narušen nemusí být jen samotný akt oplození, ale kterýkoliv krok, který mu předchází, jako je vývoj a maturace gamet nebo děje jako kapacitace či akrosomální reakce. Cesta spermie k vajíčku je velmi obtížná a většina spermií k němu vůbec nedorazí – jen ty nejlepší. Z toho je patrné, že jakékoliv narušení vývoje a maturace může být pro spermie fatální. Kvalita spermatu je jedním z klíčových faktorů úspěšného oplození a je proto alarmující s jakou rychlostí se snižuje kvalita spermií v naší, tedy lidské, populaci (WHO, 2009).

1.1 Fyziologie reprodukce

1.1.1 Spermie

Spermie je malá buňka pohybující se pomocí bičíku, která má pouze nezbytnou cytoplazmatickou výbavu a je specializovaná na přenos DNA do vajíčka. Spermie vznikají během procesu zvaném spermatogeneze, který probíhá v semenotvorných kanálcích testes. Tento proces zahrnuje sérii mitotických dělení spermatogoniálních kmenových buněk, dvě po sobě jdoucí meiotická dělení spermatocytů, rozsáhlou morfologickou remodelaci spermatid během spermiogeneze a uvolnění volných spermií do lumen semenotvorných kanálků odkud přicházejí do nadvarlat.



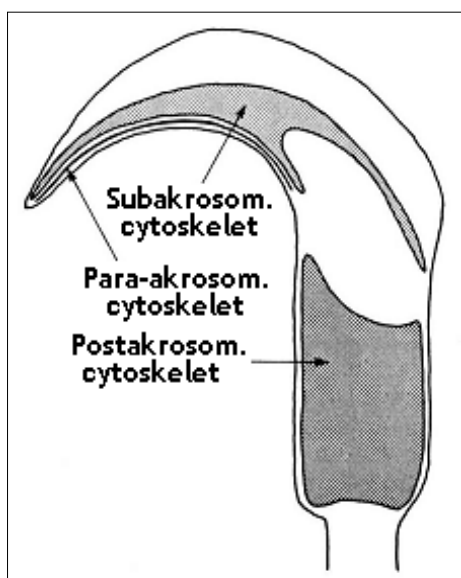
Obr. 1 – Hlavička spermie (Yanagimachi, 1994)

Savčí spermie mají dvě hlavní části – hlavičku a bičík, tyto dvě části jsou spojené krčkem.

Hlavička se skládá z akrosomu, jádra, cytoskeletárních struktur a malého množství cytoplasmy (Obr.1). Jádro obsahuje haploidní genom a vysoce kondenzovaný chromatin specifický pro spermie.

Akrosom je specifická organela spermií. Je to váček umístěný v apikální části hlavičky spermií a obsahuje hydrolytické enzymy, které jsou schopny rozštěpit glykoproteinový obal vajíčka – zona pellucida a umožní tak spermiím tímto obalem proniknout. Akrosom vzniká z Golgiho komplexu během spermiogeneze a během epididymální maturace získává svůj druhově specifický tvar a dochází k modifikaci některých akrosomálních proteinů (Kierszenbaum et al., 2007). Obsah akrosomu tvoří různé lytické enzymy, jako jsou proteázy (akrosin), glykosidázy (β -galaktosidáza, hyaluronidáza), fosfolipázy a další. Některé z nich mají funkci v interakci spermie s vajíčkem (např. akrosin), (Peknicova et al., 2001).

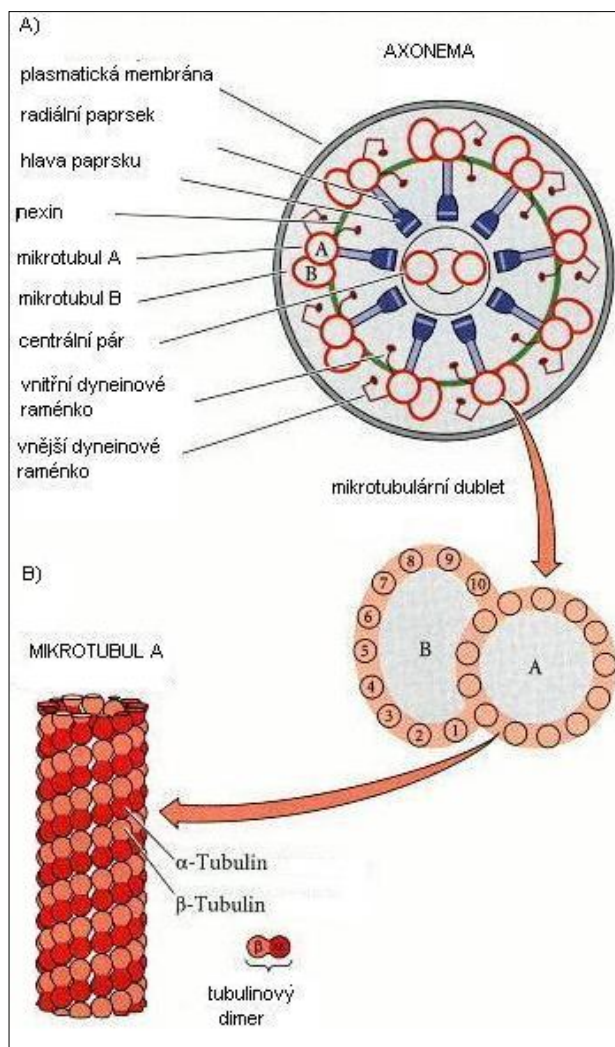
Cytoskeleton hlavičky spermie má jednak strukturní funkci – určuje tvar hlavičky spermie a splňuje i funkční roli a to když napomáhá spermii pronikat do vajíčka. Cytoskeletární struktury jsou v hlavičce savčích spermií umístěny ve třech částech – subakrosomové, postakrosomové a para-akrosomové (Obr.2). Subakrosomální cytoskeleton se nachází mezi akrosomem a jádrem a má mechanickou roli při průniku spermie do vajíčka. Postakrosomální cytoskeleton nalezneme mezi jádrem



Obr. 2 – Cytoskeleton hlavičky spermie (Yanagimachi, 1994)

a cytoplazmatickou membránou. Vytváří a udržuje typické pokrytí hlavičky spermie plasmatickou membránou. Para-akrosomální cytoskeleton se nachází mezi akrosomem a plasmatickou membránou a je typický pro hlodavčí spermie (Yanagimachi, 1994). Proteiny charakteristické pro cytoskeleton spermie jsou aktin, tubulin, vimentin a spectrin (Virtanen et al., 1984). Aktin se vyskytuje ve spermiích jak v G-formě (globulární) tak ve F-formě (fibrilární) (Moreno-Fierros et al., 1992).

Nalezneme ho v oblasti akrosomu, postekvatoriálního a ekvatoriálního segmentu a v bičíku (Ochs and Wolf, 1985). Bylo prokázáno, že polymerace aktinu je důležitá pro zahájení pohyblivosti spermií během posttestikulárního zrání (Lin et al., 2002). Polymerace a depolymerace aktinu je také nezbytná pro kapacitaci, akrosomální reakci a schopnost spermie penetrovat do vajíčka (Spumgin et al., 1995; Breitbart et al., 2005; Rogers et al., 1989). Spermie je schopna pohybu na delší vzdálenosti a to díky bičíku. Bičík savčích spermií je komplexní struktura skládající se ze čtyř částí – ze spojovací části (krček), střední části, hlavní části a koncové části. Hlavní poháněcí mechanismus bičíku se nazývá axonema. Axonema je formována mikrotubuly, které vycházejí z centrioly. Jádru axonemy se skládá ze dvou centrálních mikrotubulů obklopených řadou devíti mikrotubulových dvojic (Obr.3A). Pouze jeden z mikrotubulů z každé



Obr. 3 : motilní aparát spermie (Gilbert, 2000)

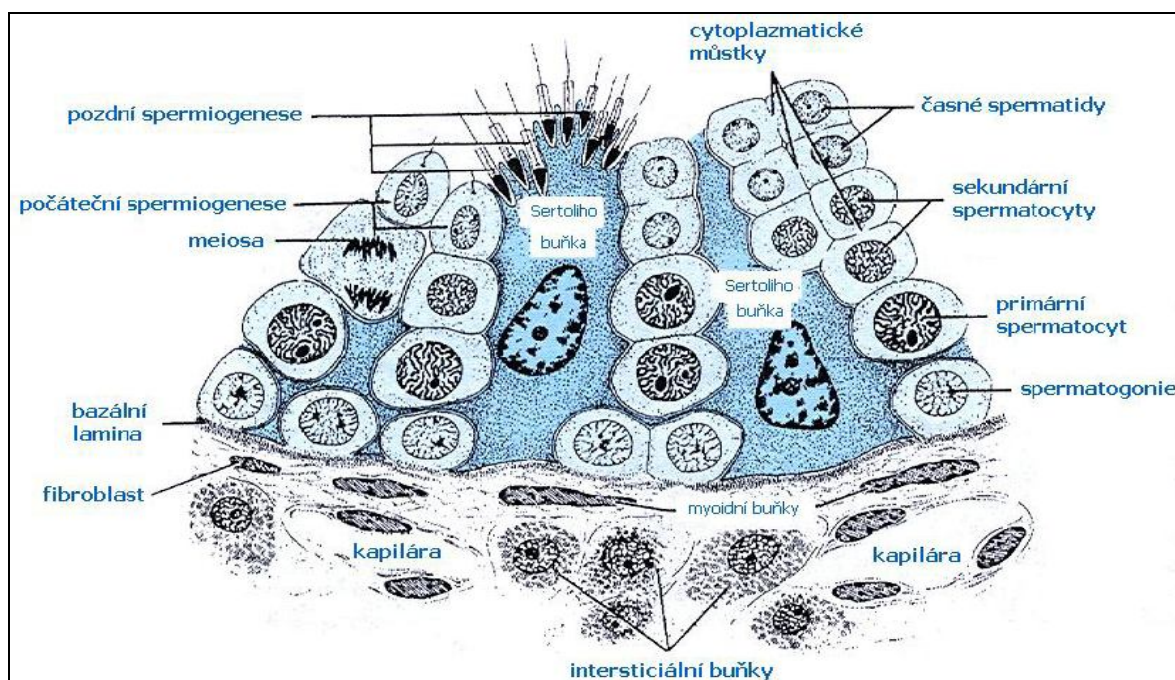
dvojice je kompletní a má 13 protofilament. Druhý má tvar písmene C a má jen 11 protofilament (Obr.3B). Tubulin je základním proteinem bičíku spermie, ale i další proteiny jsou nezbytné pro jeho správnou funkci. Sílu pro pohyb bičíku dodává protein Dynein, který je připojený k mikrotubulům (Obr.3A). Dynein hydrolyzuje molekuly ATP (Adenosintrifosfát) a uvolněná chemická energie je přeměněna na energii mechanickou, která pohání spermii. Potřebné ATP přichází z mitochondrií, které se nacházejí ve střední části bičíku v tzv. mitochondriálním pouzdře.

K axonemě přiléhají ve spojovací (krček), střední a hlavní části bičíku vnější hustá vlákna, která vyztužují bičík spermie.

1.1.2 Spermatogeneze

Spermatogeneze je proces, během kterého se z primordiálních zárodečných buněk vyvíjejí spermie – vysoce specializované buňky, které mají zásadní úlohu v oplození vajíčka. Spermatogeneze probíhá v semenotvorných kanálcích testes, které mimo primordiálních zárodečných buněk obsahují také buňky epiteliální, Sertoliho a Leydigovi buňky (Obr.4). Sertoliho buňky pomáhají vyživovat zárodečné buňky a také pomáhají koordinovat důležité děje během spermatogeneze (Eddy, 2002). Sertoliho buňky rozdělují semenotvorné váčky na dvě části – laminární a bazální. Spermatogeneze zahrnuje sérii mitotických dělení spermatogoniálních kmenových buněk, dvě meiotická dělení spermatocytů, rozsáhlé morfologické změny a uvolnění buněk do lumen semenotvorných váčků (postmeiotická fáze). Mitotická fáze probíhá v bazální části testes, zatímco meiotická a postmeiotická fáze v luminální části.

Primordiální zárodečné buňky se v gonádách dělí na spermatogonie, které mají kulovitý tvar a jsou uloženy na okrajích semenotvorných kanálků. Spermatogonie se dělí mitoticky a vznikají z nich buď další spermatogonie, aby byl zachován jejich početní stav nebo primární spermatocyty. Primární spermatocyty se dále dělí meioticky. Primární spermatocyty vstupují do prvního meiotického dělení a vzniká z nich pár sekundárních spermatocytů. Sekundární spermatocyty vstupují do druhého meiotického dělení a vznikají tak haploidní buňky nazývané spermatidy. Při meióze buňky prodělávají dvě sady dělení, dceřiné buňky tedy obsahují pouze polovinu původního počtu chromozómů. Meióza neboli redukční dělení má několik fází, pro které jsou charakteristické specifické děje. Vzniklé spermatidy podstupují proces zvaný spermiogeneze a vznikají z nich spermie. Vzniklé spermie jsou uvolňovány a putují do nadvarlete. Spermiogeneze zahrnuje spoustu dějů jako je zahušťování jádra, tvorba bičíku, odvrhování cytoplasmy a tvorba akrosomu.



Obr. 4 : Schéma stavby části semenotvorného kanálku a intersticiální tkáně (Junquiera et al., 2002).

1.1.2.1 Genová exprese v samčích zárodečných buňkách

Vývoj samčích spermií u savců probíhá ve třech fázích - mitotické, meiotické a postmeiotické. Během tohoto procesu jsou produkovány transkripty specifické pouze pro zárodečné buňky a jejich exprese je vývojově regulována. Většinou je nalezneme pouze v dané vývojové fázi. Jsou známi tři hlavní způsoby, jak tyto specifické transkripty vznikají. Mohou to být geny samčích zárodečných buněk, které jsou homologní s geny buněk somatických. Nebo to mohou být unikátní geny, které nejsou signifikantně podobné žádnému jinému genu v genomu. Třetím způsobem je produkce alternativních transkriptů, které vznikají alternativním sestřihem produktů genů vyskytujících se v somatických buňkách (Eddy, 2002).

Během procesu spermatogeneze dochází ke změnám v genové expresi, jejíž regulace je pro tento proces klíčová. Regulaci spermatogeneze je možné rozdělit na tři úrovně – vnitřní, vnější a interaktivní regulace. Vnitřní regulace je představována genetickým programem. Genetický program je zodpovědný za sled událostí, které vedou k diferenciaci zárodečných buněk během spermatogeneze. Genetický program určuje, které geny jsou exprimovány a kdy jsou exprimovány (Eddy, 2002).

Samčí zárodečné buňky se vyvíjejí synchronizovaně v překrývajících se vlnách. Každá buňka proto potřebuje komunikovat se sousedními buňkami - přijímat

od nich a zároveň poskytovat jim informace. Tato komunikace představuje zmíněnou interaktivní regulaci. Není známo, jak přesně tato regulace probíhá, ale bylo prokázáno, že hlavní roli v ní mají Sertoliho buňky.

Vnější regulace je založena na působení hormonů, hlavně testosteronu a folikuly stimulujícím hormonu (FSH). Tyto hormony přímo ovlivňují somatické buňky testes a jejich genovou expresi. Ovlivňují tak prostředí, ve kterém probíhá interaktivní regulace a nepřímo tak ovlivňují genovou expresi zárodečných buněk (Eddy, 2002).

Hypotéza, že vnitřní program zárodečných buněk má zásadní roli v jejich vývoji, byla prokázána na pokusu, kde krysí spermatogonie byly transplantovány do semenotvorných váčků myších testes. Transplantované krysí spermatogonie se vyvinuly v normálně vypadající krysí spermie. Vyvíjely se dokonce stejnou rychlostí jako v krysích testes, i když u myší je normálně vývoj rychlejší než u krys (Clouthier et al., 1996).

1.1.2.2 Exprese vybraných Heat shock proteinů během spermatogeneze

Proteiny tepelného šoku nebo-li Heat shock proteiny (Hsps) patří mezi stresové proteiny a nalezneme je ve všech tkáních. Značnou část z nich představují proteiny indukovatelné teplem či dalšími stresovými faktory, z nichž mnohé jsou v buňce normálně přítomné i za klidových podmínek. Tyto Hsps jsou nezbytné pro různé buněčné pochody a jejich funkce je rozmanitá (Neuer et al., 1999).

V buňkách za normálních (nestresových) podmínek fungují Hsps jako molekulární chaperony, jejichž hlavní funkcí je pomáhat jiným intracelulárním proteinům dosáhnout správné konformace, případně pomáhají i při skládání oligomerních struktur. Dále mají rozhodující úlohu v prevenci proti nesprávné asociaci proteinů, při intracelulárním transportu, udržování proteinů v inaktivní formě a denaturaci proteinů.

Jejich další funkcí je chránit buňky v případě stresových podmínek, jako je zvýšení teploty či jiné nepříznivé vlivy prostředí, tím že chrání proteiny před denaturací a případnou agregací (Eddy, 1999). Všechny studované organismy odpovídají na stresové podmínky syntézou Hsps. Tento typ buněčné odpovědi je velmi konzervovaný a během evoluce se příliš nezměnil (Schlesinger, 1990; Eddy, 1999).

Hsps nalezneme téměř v každé tkáni včetně testes, kde mají různé funkce. V testes je jejich exprese většinou vývojově regulovaná, což znamená, že se vyskytují jen v určitých fázích spermatogeneze. V testes nalezneme Hsps, které se nevyskytují v žádné jiné tkáni (Eddy, 2002). Jejich přítomnost či absence ovlivňuje téměř každý aspekt reprodukce. Mají nezastupitelnou roli nejen ve spermatogenezi, ale i v interakci gamet, fertilizaci a jsou mezi prvními proteiny exprimovanými v časném embryonálním vývoji (Neuer et al., 1999).

Mezi Hsps exprimované specificky v testes patří dva členové Hsp70 rodiny – Hsp70-2 a Hsc70t. Dalšími Hsps, které jsou nezbytné pro správný průběh spermatogeneze jsou mitochondriální Hsp60 a člen rodiny Hsp110 – Apg-1.

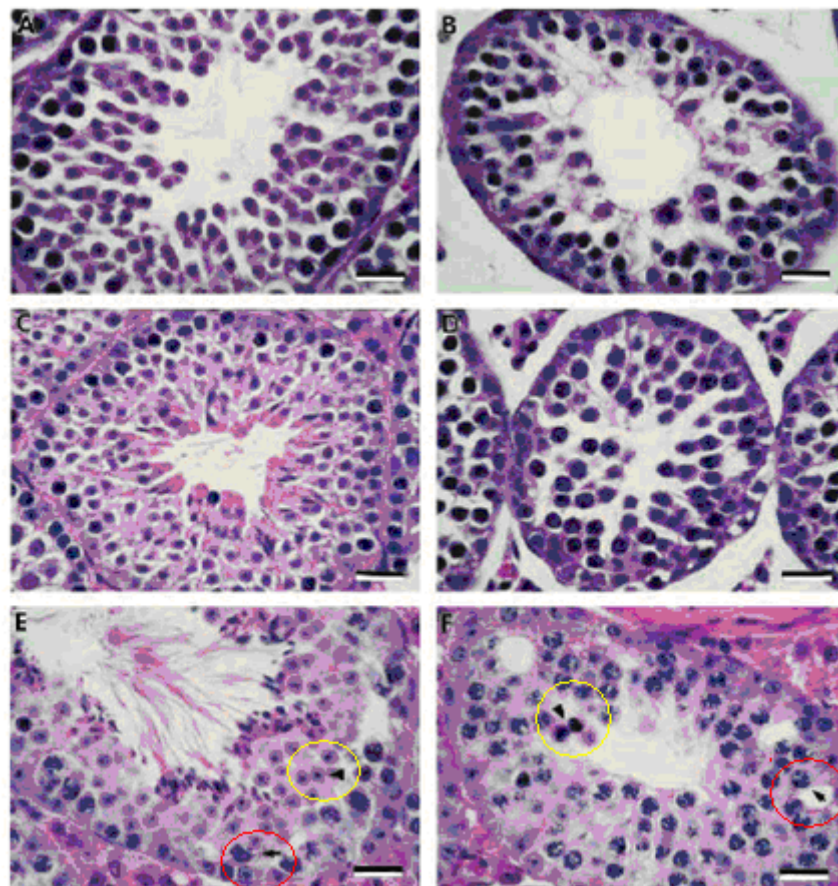
1.1.2.2.1 Spermatid-specific heat shock protein 70 (Hsc70t)

Hsc70t je člen Hsp70 rodiny, který je exprimován specificky v testes během post-meiotické fáze spermatogeneze. Nejhojněji se vyskytuje v cytoplazmě spermatid (Eddy, 1999). Pokusy provedené na mutantních myších s homozygotní mutací genu pro Hsc70t (Hsc70t^{-/-}), pomohly objasnit jeho funkci. Myši s touto mutací byly fertilní a histologické studie ukázaly, že spermatogeneze nebyla přerušena, avšak u spermií docházelo k rychlé ztrátě motility v důsledku nízké hladiny adenosintrifosfátu (ATP). Bylo prokázáno, že u těchto spermií dochází k omezené produkci ATP. Je tedy pravděpodobné, že protein Hsc70t slouží jako chaperon proteinů, které hrají roli v produkci energie (Eddy, 2002).

1.1.2.2.2 Heat shock protein 70-2 (Hsp70-2)

Hsp70-2 je dalším členem Hsp70 rodiny, jehož expresi nalezneme specificky v testes. Tento protein je exprimován během meiotické fáze spermatogeneze. Začíná být exprimován ve fázi leptotene s největším výskytem u pachyténích spermatocytů (Feng et al., 2001). Pro objasnění funkce proteinu Hsp70-2 byly opět provedeny pokusy na myších s homozygotní mutací tohoto genu (Hsp70-2^{-/-}). Hsp70-2^{-/-} myši samci byli neplodní v důsledku nedostatku post-meiotických spermatid a zralých spermií. Hmotnost testes těchto myší byla o 50% nižší než u u Hsp70-2^{+/-} a Hsp70-2^{+/+} myší, zatímco hmotnost prostaty, semenných vaků a dalších sekundárních pohlavních znaků ovlivněna nebyla. Histologická studie

prokázala, že u Hsp70-2^{-/-} myší došlo k přerušení spermatogeneze, mitotické a meiotické buňky byly přítomny, zatímco post-meiotické zárodečné buňky a spermie nikoliv – došlo tedy k přerušení meiózy (Obr.5), (Dix et al., 1997).



Obr. 5 : Morfologie semenotvorných kanálků u Hsp70-2^{+/+} (A, C, E) a u Hsp70-2^{-/-} (B, D, F) myší. Stáří 24 dnů (A, B), 28 dnů (C, D) a dospělost (E, F). U 24 dnů starých Hsp70-2^{+/+} myší byly pozorovány hlavně spermatidy (A) a ve stáří 28 dnů prodlužující se spermatidy (C). Zatímco u Hsp70-2^{-/-} myší byly pozorovány převážně degenerující buňky s nerozpoznatelnou chromosomální strukturou (B, D). V dospělosti většina semenotvorných kanálků u Hsp70-2^{-/-} (F) myší obnoví svoji organizaci a jsou zde viditelné spermatocyty (fáze pachytene je označena šipkou v červeném kroužku) a apoptické buňky (označeny hrotem šipky ve žlutém kroužku), zatímco post-meiotické buňky a prodlužující se spermatidy přítomny nejsou. Naproti tomu u dospělých Hsp70-2^{+/+} myší (E) byly v semenotvorných váčcích pozorovány spermatocyty (označeny šipkou v červeném kroužku), spermatidy (označeny hrotem šipky ve žlutém kroužku) a prodlužující se spermatidy uvolňované do lumen váčku (Dix et al., 1997).

Příčina nedokončení meiózy u Hsp70-2^{-/-} myší patrně vyplývá z funkce, jakou tento protein hraje během buněčného cyklu a to při přechodu z G₂ fáze do M fáze spermatocytů. Bylo prokázáno, že Hsp70-2 je nezbytným pro správnou funkci CDC2/cyklin B1 komplexu (Zhu et al., 1997). CDC2/cyklin B1 komplex je složen z cyklin B1 regulační podjednotky a CDC2 katalytické podjednotky. CDC2 katalytická podjednotka má kinázovou aktivitu, kterou získává až po navázání cyklin B1 podjednotky. CDC2/cyklin B1 komplex. Tento komplex se pak nazývá maturation promoting factor – MPF. MPF je nezbytný pro přechod z G₁ do S fáze a z G₂ do M fáze buněčného cyklu (Dunphy et al., 1998). Bylo prokázáno, že Hsp70-2 asociuje s CDC2 podjednotkou a pravděpodobně ji pomáhá zaujmout správnou konformaci. U Hsp70-2^{-/-} myší byla přítomna CDC2 podjednotka i cyklin B1 podjednotka, ale tyto podjednotky nebyly schopné vytvořit funkční komplex. Z tohoto důvodu CDC2 podjednotka postrádala kinázovou aktivitu a došlo k zastavení buněčného cyklu. Souvislost mezi HSP70-2 a nefunkčním komplexem CDC2/cyklin B1 byla prokázána pokusem *in vitro*, kdy do čerstvě připraveného extraktu z testes Hsp70-2^{-/-} myší byl přidán HSP70-2. Došlo k sestavení CDC2/cyklin B1 komplexu a navíc byla obnovena CDC2 kinázová aktivita (Zhu et al., 1997). Tyto výsledky prokázaly hypotézu, že Hsp70-2 protein je nezbytný k vytvoření funkčního CDC2-cyklinB1 komplexu.

Allen et al. (1996) prokázali, že Hsp70-2 je součástí synaptonemálního komplexu a je nezbytný pro jeho správnou funkci. Synaptonemální komplex je struktura vznikající během zygotene meiotické profáze. V této fázi dochází k seřazení homologních chromozomů uprostřed buňky a vzniklá struktura se nazývá synaptonemální komplex. Později během diplotene dochází k desynapsy, chromozomy kondenzují a dochází k I. meiotickému dělení (Dix et al. 1997). U Hsp70-2^{-/-} myší byl detekován synaptonemální komplex, nedošlo však k pozdější desynapsy a tyto buňky nebyly schopné dokončit I. meiotické dělení (Dix et al. 1996, Dix et al., 1997). Zdá se tedy, že přítomnost Hsp70-2 je nezbytná pro desynapsi synaptonemálního komplexu a tím i pro dokončení meiotického dělení.

Bylo tedy prokázáno, že Hsp70-2 je nezbytný pro správný průběh spermatogeneze a v jeho nepřítomnosti dochází k přerušení meiózy a je započata apoptosa spermatogenních buněk.

Zajímavé zjištění zaznamenala skupina W. Widlaka (Widlak et al., 2007). Provedli pokusy s transgeními myšima u kterých byl konstitutivně exprimován aktivní

HSF1, což je primární transkripční faktor zodpovědný za odpověď na různé formy buněčného stresu (Baler et al., 1993). U myší s konstitutivně exprimovaným HSF1 došlo k indukci kaspasy -3-dependentní apoptose a samčí neplodnosti. Překvapivě bylo zjištěno, že u těchto transgeních myší dochází mimo jiné k down regulaci Hsp70-2, ikdyž funkce HSF je naopak upregulovat expresi HSPs. Původně se předpokládalo, že HSF1 se váže přímo na sekvenci v Hsp70-2 promotoru, ale další výzkumy ukázaly, že tomu tak není. K ovlivnění exprese pravděpodobně dochází nepřímo přes další transkripční faktory. Bylo zjištěno, že u transgeních myší konstitutivně exprimujících HSF1 dochází k down regulaci čtyř transkripčních faktorů a k up regulaci dvou transkripčních faktorů, které se hypoteticky mohou vázat na promotor Hsp702 genu a ovlivňovat tak jeho transkripci (Widlak et al., 2007).

1.1.2.2.3 Heat shock protein 60 (Hsp60)

Hsp60 je mitochondriální protein, který je kódován jadernou DNA, syntetizován cytoplazmatickými ribozomy a po té transportován do mitochondriální matrix. V mitochondriích pak slouží jako chaperon nově importovaných proteinů a je také zodpovědný za transport proteinů z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru (Meinhardt et al., 1995; Werner et al., 1997).

Většina mitochondriálních proteinů je kódována jadernou DNA, syntetizována v cytoplazmě a poté transportována do mitochondrií. Je tedy patrné, že funkce Hsp60 jako mitochondriálního chaperonu je nezbytná pro správnou funkci mitochondrií a tím i celé buňky,

Hsp60 je mimo jiné exprimován v testes, a to jak v spermatogenních buňkách, tak v Sertoliho a Leydigových buňkách. Exprese Hsp60 v spermatogenních buňkách je vývojově regulována a vyskytuje se jen v určitých stádiích. Exprese Hsp60 se vyskytuje u spermatogonií a je závislá na stupni proliferace – nejvyšší u mitoticky se dělících buněk. Exprese Hsp60 byla prokázána i u ranných spermatocytů, ale nebyla detekována u raných pachyténích spermatocytů a následujících stádií (Meinhardt et al., 1998).

U spermatogonií se vyskytují normální mitochondrie, které se neliší od mitochondrií somatických buněk a nenalezneme v nich Hsp60. Avšak ve spermatogenních buňkách se vyskytuje specializovaný tzv. kondenzovaný typ

mitochondrií, který nalezneme v meiotických a postmeiotických spermatogenních buňkách. U tohoto typu mitochondrií se Hsp60 nevyskytuje (Meinhardt et al., 1998).

Mitochondrie jsou orgány, které jsou nezbytné pro správnou funkci buňky a při jejich poškození či nesprávné funkci buňka zaniká. Exprese Hsp60 je nejvyšší u mitoticky se dělících buněk patrně proto, že je potřeba vytvořit další mitochondrie pro dceřiné buňky. Proto nedostatečná exprese Hsp60 vede k narušení mitotického dělení spermatogonií a tím i k nedostatečné spermatogenezi (Meinhardt et al., 1995).

1.1.2.2.4 Heat shock protein APG-1

Heat shock protein Apg-1 (**A**TP and **p**eptide binding protein in **g**erm cells) patří do rodiny proteinů Hsp 110. Exprese Apg-1 se vyskytuje ve všech myších tkáních, převážně však v testes. Nalezneme ho ve všech typech spermatogenních zárodečných buněk (Kaneko et al., 1997a).

Přesná funkce Apg-1 není známá, ale bylo prokázáno, že je nezbytný pro správný průběh spermatogeneze. Opět byly provedeny pokusy na myších s homozygotní mutací genu pro Apg-1 ($Apg1^{-/-}$). $Apg1^{-/-}$ myši samci byli neplodní v důsledku nedostatku zralých spermií a problémům s jejich motilitou. Dále byla pozorována zvýšená frekvence apoptosy zárodečných buněk. Pozdní spermatocyty, meiotické buňky a haploidní zárodečné buňky vykazovaly znaky degenerace jako kondenzace chromatinu, fragmentace DNA či předčasné uvolnění zárodečných buněk do lumen (Held et al., 2006).

1.1.3 Apoptosa zárodečných buněk v testes

Apoptosa, neboli programovaná buněčná smrt, je evolučně konzervovaný proces, který hraje klíčovou roli během normálního vývoje a při udržování homeostaze organismu. Je hlavním procesem uplatňujícím se při formování různých částí těla, odstranění nepotřebných struktur a odstranění nepotřebných či potenciálně nebezpečných buněk (Jacobson et al., 1997). Apoptosa může být buď vývojově regulována, nebo indukována v důsledku buněčného stresu či zranění.

U dospělých savců, včetně lidí, hraje apoptosa důležitou roli i během spermatogeneze. Spermatogeneze je složitý a dynamický proces, při kterém

z kmenových diploidních buněk – spermatogonií vznikají haploidní spermie. Toto se děje přes sérii událostí zahrnujících mitózu, meiózu a buněčnou diferenciaci. Ovšem ne všechny zárodečné buňky dosáhnou zralosti a diferencují na spermie. Apoptosa spermatogenních buněk v testes je u savců rozšířeným jevem. Nejčastěji k ní dochází u spermatogonií, ale můžeme ji pozorovat v průběhu celé spermatogeneze (Allan et al., 1992). U zdravého jedince dochází k zániku asi 75% zárodečných buněk, což může sloužit jednak k odstranění vadných zárodečných buněk, nebo k redukci zárodečných buněk na počet, o který jsou schopny se postarat Sertoliho buňky. Sertoliho buňky také podstupují apoptosu, která *in vivo* slouží k formování semenotvorných váčků. Bylo prokázáno, že spontánní i vyvolaná smrt zárodečných buněk se děje téměř výhradně apoptosou (Sinha Hikim and Swerdloff, 1999).

Proces apoptosy je asociován s dobře definovanými morfologickými a biochemickými změnami, které mají svůj řád a účel. V savčím organismu se také vyskytuje zánik buněk procesem zvaným nekrosa. Tento proces se zásadně liší od programované apoptotické smrti. Nekrosa je pasivní proces, který nevyžaduje energii a nevyskytuje se přirozeně během vývoje. Obvykle postihuje i skupinu sousedících buněk a je charakterizována nabobtnáním buňky a jejích organel (což je výsledkem selhání iontových pump), které vyústí až k prasknutí membrány - lyzi buňky a uvolnění škodlivého obsahu do okolí, což často způsobí zánětlivou reakci. Oproti tomu apoptotické buňky jsou selektivně rozpoznány fagocytickými buňkami a odstraněny před tím než by mohlo dojít k jejich lyzi. Během rané fáze apoptosy dochází ke změně fosfatidylserin asymetrie (Sinha Hikim and Swerdloff, 1999) což je pravděpodobně klíčový faktor při rozpoznání apoptotických buněk fagocyty.

Nejběžnější metoda používaná k detekci apoptotických buněk je metoda zvaná TUNEL assay – TdT-mediated dUTP nick-end labelling. Tato metoda slouží k označení fragmentace DNA, která je výsledkem apoptotické signální dráhy. Pomocí enzymu terminální deoxynukleotidyl-transferasa dojde k navázání označeného dUTP na 3'OH konce DNA.

1.1.3.1 Průběh apoptosy v savčích buňkách

Apoptosu indukuje řada rozmanitých často zcela nepodobných signálů, které mohou být jak extracelulární (toxiny, hormony, růstové faktory apod.) tak intracelulární. Intracelulární signál je často zahájen v odpovědi na stres, jako je teplota, radiace, nedostatek živin, virová infekce apod.

Hlavními vykonavateli apoptotického procesu jsou enzymy – kaspasy. Kaspasy patří do rodiny cysteinových proteáz (obsahují aktivní cysteinový zbytek nutný pro proteolytickou aktivitu), které štěpí substráty v místě za zbytkem kyseliny asparagové. Tyto enzymy jsou v buňkách přítomny v inaktivní formě, která je štěpena poté, co buňka přijme apoptotický signál a vzniká tak aktivní forma enzymu, která indukuje apoptosu. Z funkčního hlediska lze kaspasy rozdělit do 3 skupin:

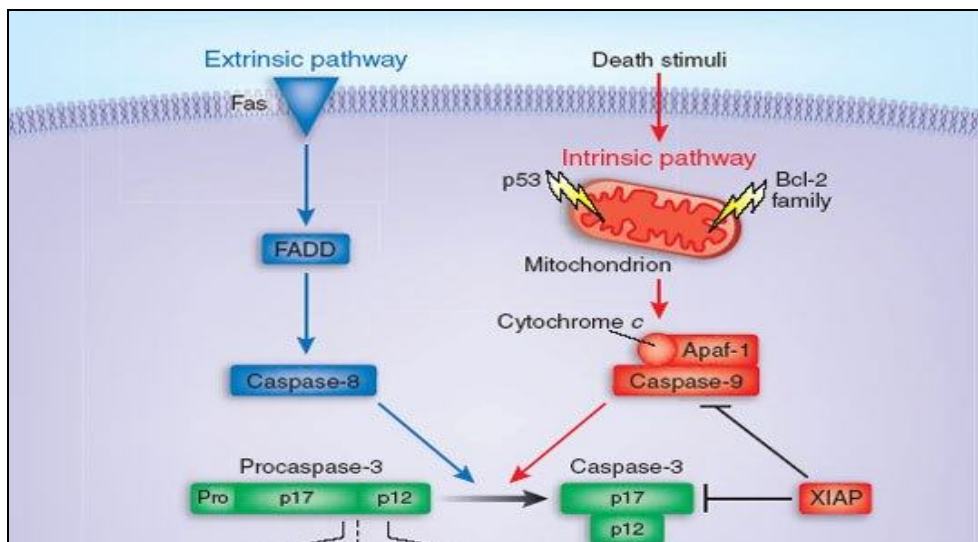
- ❖ Iniciační kaspasy (kaspasa 2, kaspasa 8, kaspasa 9, kaspasa 10). Tyto kaspasy jsou aktivovány na začátku apoptosy a iniciují ji. Mohou aktivovat další kaspasy.
- ❖ Exekuční kaspasy (kaspasa 3, kaspasa 6, kaspasa 7), jsou aktivovány iniciačními kaspasami a jsou vlastními vykonavateli apoptosy – štěpí tzv. „substráty smrti“ (mezi něž patří proteiny cytoskeletu, proteiny řídící opravu DNA, proteiny zabírající apoptose apod.). kaspasa 3 hraje pravděpodobně klíčovou úlohu v exekuci apoptosy.
- ❖ Zánětlivé kaspasy (kaspasa 1, kaspasa 4, kaspasa 5). Tyto kaspasy aktivují zánětlivé cytokiny, jako jsou interleukin 1 a interleukin 18.

Jakmile dojde k aktivaci kaspas stává se proces apoptosy nevratným. V procesu aktivace kaspas jsou zahrnuty 2 hlavní signální cesty (Obr.6):

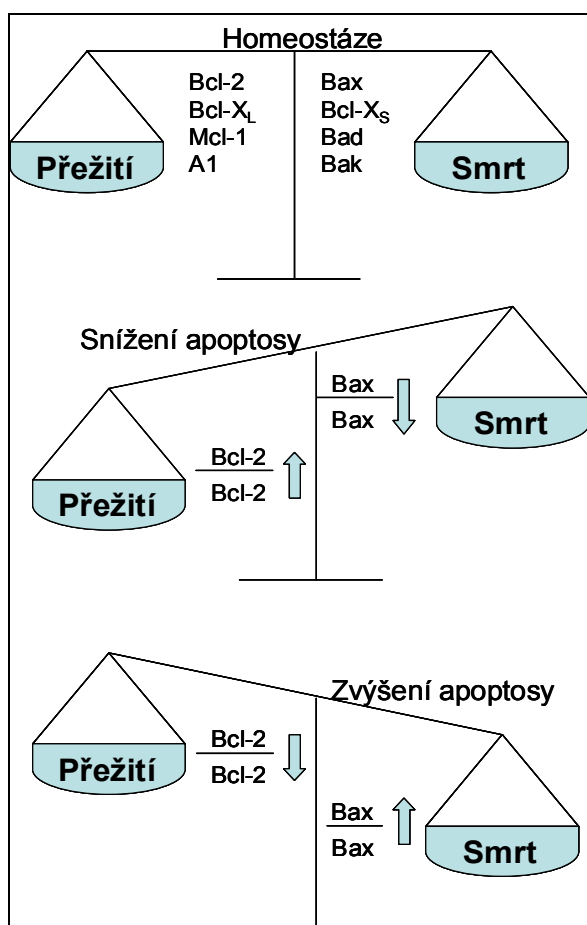
- 1) Na mitochondriích závislá cesta – zde hrají klíčovou roli proteiny z rodiny Bcl-2. Tato rodina obsahuje jak proapoptotické proteiny (např. Bax, Bad, Bak) tak antiapoptotické proteiny (např. Bcl-2, Mcl-1, A1). Poměr proapoptotických a antiapoptotických proteinů v buňce je klíčový pro osud buňky. S tím že nadbytek proteinu Bcl-2 vede k přežití buňky, naproti tomu nadbytek proteinu Bax vede k buněčné smrti (Sinha Hikim and Swerdloff, 1999) (Obr. 7). Vlivem apoptotického signálu dochází k signální dráze, která vede k vazbě proapoptického proteinu Bad k antiapoptotickým proteinům Bcl-2 a Bcl-xl

umístěných ve vnější mitochondriální membráně. Tato vazba zabrání vniku vazby mezi antiapoptotickými proteiny Bcl-2 a Bcl-xl s proapoptickými proteiny Bax, které jsou rovněž umístěny ve vnější mitochondriální membráně. Bax se tímto stává aktivním a tvoří homo-oligomerní kanál, který umožňuje vtok iontů do mitochondrií. Vtok iontů do mitochondrií způsobí uvolnění cytochromu c z mitochondrií do cytosolu. V cytosolu se cytochrom c váže k proteinu Apaf-1 (apoptotic protease factor 1) a tím ho aktivuje. Aktivovaný Apaf-1 s navázaným cytochromem c váže ještě nukleotid dATP a tvoří tak oligomerní strukturu – apoptosome. Jakmile je apoptosome formován váže a aktivuje iniciační kaspasu 9. Jakmile je kaspasa 9 aktivována může aktivovat exekuční kaspasy (kaspasa 3) a spustit tak kaskádu dějů vedoucích k buněčné smrti. Proteiny Bcl-2 rodiny byly lokalizovány i v mužských zárodečných buňkách (Oldereid et al., 2001).

- 2) Receptor Fas a jeho ligand FasL – apoptosa může být spuštěna interakcí mezi receptorem Fas a ligandem FasL . FasL je povrchový protein, který je exprimován aktivovanými NK buňkami nebo cytotoxickými T lymfocyty a jeho exprese byla zjištěna i v Sertoliho buňkách. Fas je povrchový receptor, jehož exprese byla zjištěna v primárních spermatocytech s abnormálními rysy a ojediněle také ve spermatidách (Francavilla et al., 2000). Vazba FasL na Fas receptor způsobí trimerizaci Fas receptoru. Trimerní Fas receptor se váže na protein FADD (Fas associated death domain), který aktivuje iniciační kaspasu 8 a ta dále aktivuje exekuční kaspasy 3, 6, 7. Fas ligand a Fas receptor systém jsou součástí signalizace mezi Sertoliho a zárodečnými buňkami a bylo prokázáno, že přispívá k odstranění abnormálních zárodečných buněk a je tedy důležitý pro normální průběh spermatogeneze (Pentikainen et al., 1999).



Obr. 6 – Signální cesty vedoucí k aktivaci exekuční kaspasy 3 (Porter, 2006)



Obr. 7 – Regulace apoptosy pomocí proteinů z rodiny Bcl-2 (převzato z Sinha Hikim and Swerdloff, 1999).

1.1.3.2 Strukturální rysy buněčné smrti způsobené apoptosou

V rané fázi spermatogeneze nastává kondenzace chromosomů a buňka se smrskává. Organely většinou zůstávají nepoškozené. Také dochází ke změnám ve struktuře plasmatické membrány – fosfatidylserin, který se normálně nachází na vnitřní straně cytoplasmatické membrány je vysunut na její vnější povrch (Sinha Hikim and Swerdloff, 1999). Fosfatidylserin je brán jako membránový marker rané apoptosy (Martin et al., 1995). Dále dochází k jevu zvaném „blebbing“ membrány – tvorba váčkovitých výrůstků z membrány způsobená rozkladem cytoskeletu. V pozdní fázi apoptosy dochází k fragmentaci jádra a cytoplasmy a tvoří se apoptotická tělíska, která jsou pohlceny fagocytujícími buňkami.

1.1.4 Post-testikulární maturace

Spermie opouštějící varle nemají schopnost oplodnit vajíčko. Tuto schopnost získávají až při průchodu nadvarletem (epididymis). Při tomto procesu, který se nazývá epididymální maturace, získávají spermie schopnost pohybu. Dále dochází k výrazným změnám plasmatické membrány –

- roste záporný náboj na povrchu spermií,
- mění se umístění intramembránových proteinů a glykoproteidů,
- některé proteiny jsou upravovány, maskovány nebo nahrazeny novými proteiny přicházejícími z epididymu,
- membránové lipidy spermií mění své fyzikální a chemické vlastnosti,
- vytváří se receptory pro interakci spermií s vajíčkem
- dochází ke změnám v lektin vázajících schopnostech povrchu spermie
- vytváří se a mění se fluidita membrány vlivem integrace cholesterolu do membrány (Aitken et al., 2007; Yanagimachi, 1994).

K těmto změnám dochází postupně, jak spermie prochází epididymem, pro každou část epididymu (capus-hlava, corpus – tělo a cauda – ocas) jsou charakteristické určité děje (Aitken et al., 2007).

Ejakulované spermie se dostávají do styku se semenou plasmou. Semenná plasma je složena ze sekretu semenných vaků, prostaty, Cowperových žláz a nadvarlete. Obsahuje nízkomolekulární látky (Na^+ , K^+ , fruktosa, citrát, volné aminokyseliny) i látky o vyšších molekulových hmotnostech, jako jsou různé

polypeptidy, glykoproteidy a enzymy (Jonakova et al., 2000; Manaskova et al., 2002). Kontakt se semenou plasmou vyvolává další změny na povrchu spermií – mění se celkový náboj membrány, složení lipidů a fosfolipidů a dochází k integraci lipoproteinů. Dále se na povrch spermie váží proteiny semenné plasmy, které hrají roli při primární vazbě spermie na vajíčko a další proteiny, které chrání receptory důležité pro vazbu gamet (Manaskova et al., 2002).

Ejakulované spermie stále nejsou schopné oplodnit vajíčko, tuto schopnost získávají až při průchodu samičím reprodukčním traktem. Při migraci samičím reprodukčním traktem spermie podstupuje řadu biochemických a biofyzikálních změn označovaných jako kapacitační proces. Mechanismus tohoto procesu není příliš dobře znám, ale je prokázáno, že je nezbytný pro pozdější akrosomální reakci a oplodnění vajíčka. Proces kapacitace je spojován především se zvýšením tyrosinové fosforylace proteinů spermie, zvýšením intracelulární koncentrace vápníku, sodíku a bikarbonátu a naopak snížením intracelulární koncentrace chloridových a zinečnatých iontů (De Jonge et al., 2005; Baldi et al., 1996). Během kapacitace rovněž dochází ke změnám ve složení a distribuci lipidů a fosfolipidů v plazmatické membráně (Yanagimachi, 1994), zvyšuje se syntéza fosfatidylcholinu a lysofosfolipidů (Baldi et al., 1996).

Dalším procesem spojeným s kapacitací je tzv. hyperaktivace, kdy spermie změní charakter svého pohybu. Bičík hyperaktivované spermie se mrská v hlubokých ohybech a pohyb je méně symetrický. Hyperaktivované spermie snadněji pronikají ovidukálním mukusem a kumulární matrix vajíčka a umožňují spermii dosáhnout ZP vajíčka (de Lamirande et al., 1997).

Navázání spermie na ZP vajíčka indukuje další důležitý děj zvaný akrosomální reakce (AR). Během AR dochází k exocytóze akrosomu, kdy uvolněné lytické enzymy pomáhají spermii proniknout glykoproteinovým obalem vajíčka (Zona pellucida – ZP). Vylitím akrosomu dojde také k odhalení molekul v oblasti ekvatoriálního segmentu spermie, které umožňují fúzi membrány spermie s membránou vajíčka a dochází tak k fúzi gamet (Baldi et al., 1996).

1.1.5 Oplození

Jak již bylo řečeno výše, oplození je děj, kdy dochází k fúzi gamet. Než dojde k oplození, musí obě gamety podstoupit složitý vývoj, aby se staly schopné

vzájemné fúze. V případě spermií je to spermatogeneze, epididymální maturace a vazba specifických proteinů během ejakulace. Dále spermie musí podstoupit řadu dějů odehrávajících se již v samičím reprodukčním traktu – kapacitace, průnik kumulárními buňkami vajíčka, rozpoznání a vazba gamet, akrosomální reakce a splynutí gamet.

Když se kapacitovaná spermie dostane k vajíčku, musí nejprve proniknout vrstvou kumulárních buněk, kterými je ovulovaný oocyt obklopen. Oocyt je obklopen těmito buňkami již ve folikulu a těsně před ovulací dochází k jejich expanzi. Kumulární buňky chrání a vyživují oocyt, též syntetizují do extracelulární matrix kyselinu hyaluronovou, která zde polymeruje a je tak vytvořen komplex, který nabývá 20 až 40-krát většího objemu než má samotné vajíčko (Chen et al., 1990). Pouze kapacitované spermie s intaktním akrosomem mohou pronikat kumulárním buňkami. Kapacitované spermie mají na svém povrchu enzym hyaluronidasu, který je schopen štěpit kyselinu hyaluronovou a napomáhá tak snadnému pronikání spermie kumulárními buňkami. Když se spermie dostane až k zona pellucida (glykoproteinový obal) vajíčka dochází k primární vazbě gamet. Tato vazba je zprostředkována komplementárními receptory na zona pellucida oocytu a na povrchu spermie a je druhově specifická.

Primární vazba gamet spouští akrosomovou reakci. Akrosomová reakce zahrnuje fúzi vnější akrosomové membrány a plasmatické membrány spermie a následné vylití akrosomového obsahu. Jeden z glykoproteinů zona pellucida (ZP3) reaguje s receptorem na povrchu spermie a spouští tak řetězovou reakci, která vede k indukci akrosomové reakce. Po fúzi vnější akrosomové membrány a plasmatické membrány spermie se na povrch dostává vnitřní akrosomová membrána na které je protein proakrosin, který se váže ke glykoproteinům zona pellucida (ZP2) a dochází tak k sekundární vazbě gamet (Tesarik et al., 1990). Akrosomová reakce slouží jako selekční proces pro výběr životaschopných a akrosom intaktních spermií. Spermie, které prodělají akrosomovou reakci předčasně ztrácí svůj fertilizační potenciál, nejsou schopny pronikat kumulárními buňkami a nejsou schopny se vázat na zona pellucida vajíčka.

Po akrosomové reakci proniká spermie skrze zona pelucida. Tento průnik je možný díky hydrolytické aktivitě enzymů uvolněných z akrosomu a také se na něm podílí mechanický pohyb bičíku.

Po průchodu zona pellucida se spermie dostává k cytoplazmatické membráně vajíčka a dochází k fúzi membrán. Fúze membrán začíná v oblasti ekvatoriálního segmentu spermie a pokračuje přes zadní oblast hlavičky spermie. Ihned po vazbě spermie na vajíčko dochází k tzv. primárnímu bloku polyspermie. Primární neboli rychlý blok polyspermie je založen na změně membránového potenciálu z negativního na pozitivní. Změna membránového potenciálu je vyvolána vtokem Na^+ iontů. Na rychlý blok polyspermie navazuje sekundární neboli pomalý blok polyspermie. Fúze gamet indukuje uvolnění Ca^{2+} z intracelulárních zásob vajíčka a dochází tak k zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} . Tyto změny vyvolají tzv. kortikální reakci, která je charakterizována exocytózou kortikálních granulí. Kortikální granula jsou sekreční váčky, které jsou umístěné přímo pod plasmatickou membránou oocyty. Zvýšená koncentrace intracelulárního vápníku vyvolá fúzi membrány kortikálních granulí s plasmatickou membránou oocyty. Kortikální granule obsahují lytické enzymy (serinové proteázy), které mají za úkol odstranit receptory na zonna pellucida, zonna pelucida tak ztratí schopnost vázat další spermie (Ducibella, 1996).

U savců vstupuje spermie do oocyty, který je v metafázi druhého meiotického dělení. Po průniku spermie dochází k dokončení anafáze II a telofáze II, k oddělení sekundárního polárního tělíska a k tvorbě samičího pronukleu. Také dochází k dekondenzaci jádra spermie a k tvorbě samčího pronukleu. Pravé jádro u savců vzniká až ve dvoubuněčném stadiu fúzí obou prvojader.

1.2. Patologie lidské reprodukce

Neplodnost v lidské populaci je v dnešní době závažným problémem. Podle světové zdravotnické organizace (WHO, 2009) má až 15% párů v reprodukčním věku problémy v oblasti reprodukce s tím, že ze 40-60 % je příčina na straně muže. V posledních letech také dochází k markantnímu poklesu kvality spermií u mužů. Před 20-ti lety byla průměrná koncentrace spermií u mužů s normálním spermiogramem 50 miliónů spermií na mililitr, z čehož bylo 50 % morfologicky normálních. Zatímco v dnešní době je průměrná koncentrace snížena na 15 miliónů spermií na mililitr, z čehož je pouze 5% morfologicky normálních (WHO, 2010).

Příčin mužské neplodnosti je celá řada.

- Snížená kvalita spermatu
 - Oligospermie – nízká koncentrace spermií v ejakulátu. Často je tato porucha spojena s morfologickými abnormalitami a sníženou pohyblivostí (oligoasthenoteratozoospermie).
 - Asthenospermie – snížená pohyblivost spermií. Je jednou z hlavních příčin neplodnosti mužů.
 - Teratospermie – přítomnost spermií s abnormální morfologií, např. globospermie, což jsou spermie, u kterých není vyvinut akrosom a mají proto kulatou hlavičku.
 - Aspermie – žádné spermie v ejakulátu. Tento defekt je příčinou až 20 % případů mužské neplodnosti.
- Imunologická neplodnost – tvorba protilátek proti vlastním spermiím
- Infekční onemocnění pohlavního ústrojí – nejčastěji postihují nadvarlata, varlata, močovou trubici a prostatu.
- Varikokéla – rozšíření žil v šourku. Lze odstranit chirurgickým zákrokem.
- Neprůchodnost vývodných cest – cesty zajišťující transport spermií mohou být neprůchodné. Tento jev bývá příčinou tzv. obstrukční aspermie, kdy spermatogeneze probíhá normálně, ale v ejakulátu nejsou žádné spermie.
- Kryptorchismus – porucha sestupu jednoho nebo obou varlat do šourku. Jedná se o nejčastější vrozenou vadu spojenou s mužskou neplodností.
- Nádory testes – nejčastějším nádorovým onemocněním u mužů ve věkové kategorii 20 – 40 let.
- Genetické abnormality – poruchy genů, které jsou nezbytné pro správný průběh spermatogeneze a vývoje pohlavních orgánů.
- Polutanty životního prostředí – syntetické látky, které se uvolňují do prostředí a mohou negativně ovlivňovat zdraví a reprodukci zvířat i lidí.

Příčin vzrůstající lidské neplodnosti může být mnoho, avšak vzhledem k markantnímu zhoršení situace v posledních letech se příčina připisuje hlavně stále se zhoršujícímu životnímu prostředí a životnímu stylu. Proto se v poslední době začala pozornost soustředit na polutanty životního prostředí. Každým dnem jsou uvolněna kvanta těchto látek do prostředí, dostávají se do pitné vody, do

potravin i vzduchu. Je pro to důležité odhalit, které z těchto látek mají vliv na reprodukci zvířat a lidí a pokusit se eliminovat jejich užití.

1.2.1 Polutanty životního prostředí

Jak již bylo zmíněno výše, polutanty životního prostředí jsou syntetické látky, které se uvolňují do prostředí a mohou negativně ovlivňovat zdraví a reprodukci zvířat i lidí. Mnoho z nich účinkuje jako tzv. endokrinní disruptory. Endokrinní disruptory jsou hormonálně aktivní látky, které mohou narušit funkci přirozených endogenních hormonů (Colborn et al., 1993). Tyto látky mohou působit různými mechanismy. Některé z těchto látek mají anti-androgenní účinek. Látky s anti-androgenním účinkem jsou schopné vázat se na androgenní receptory a blokují tak účinek androgenů na cílové orgány. Tento jev byl popsán například u vinklozolinu (Hellwig et al., 2000; Elzeinova et al., 2008). Jiné látky mohou reagovat s estrogenními receptory a bránit tak účinku našich přirozených endogenních hormonů. Tyto látky dělíme dle původu jejich vzniku na xenoestrogeny, vznikající lidskou činností a fytoestrogeny, které se přirozeně vyskytují v rostlinách. Jak xenoestrogeny tak fytoestrogeny se mohou dostávat do organismu jídlem či pitím. Mezi xenoestrogeny patří na příklad bisfenol, nonylfenol či diethylstilbestrol a v mnoha studiích byl prokázán negativní vliv těchto látek na reprodukční parametry savců (myši či potkaní model), (Peknicova et al., 2002; Kyselova et al., 2003; Kyselova et al., 2004; Newbold et al., 2007).

Velkou skupinu látek, které řadíme mezi polutanty životního prostředí a které by mohly mít vliv na zdraví a reprodukci savců, tvoří tzv. zpomalovače hoření. Tyto látky se používají jako přísada do hořlavých materiálů, aby redukovali jejich hořlavost a zlepšili tak požární bezpečnost. Nejdůležitější a nejrozšířenější skupinou těchto látek jsou tzv. bromované zpomalovače hoření.

1.2.1.1 Bromované zpomalovače hoření

Bromované zpomalovače hoření jsou v současné době nejvíce používanými zpomalovači hoření díky jejich efektivitě a nízkým nákladům. Jejich produkce stále roste, v roce 1900 byla světová poptávka 145 000 t/rok, zatímco v roce 2000 to bylo již 300 000 t/rok (Alaee et al., 2003). Díky struktuře a bromidovým substituentům je

mnoho z bromovaných zpomalovačů hoření perzistentní, lipofilní a bylo prokázáno, že může docházet i k jejich bioakumulaci (de Wit, 2002; Segev et al., 2009). Tyto látky byly nalezeny v prostředí a to i v značné vzdálenosti od místa jejich použití. Všechny tyto skutečnosti jsou důvodem zařazení bromovaných zpomalovačů hoření mezi potencionální endokrinní disruptory. Mezi bromované zpomalovače hoření patří mnoho látek. Nejhojněji využívanými jsou čtyři skupiny – polybromované biphenyl ethery (PBDEs), hexabromcyklododekan (HBCD), polybromované biphenyly (PBBs) a tetrabrombisphenol A (TBBPA). Bylo prokázáno, že TBBPA je uvolňován do prostředí, tento fakt v kombinaci s jeho vysokou spotřebou je důvodem k podrobnějšímu zkoumání vlivu této látky na zdraví zvířat a lidí.

1.2.1.2 Tetrabrombisfenol A

Tetrabrombisfenol A (TBBPA) je vysoce lipofilní halogenová molekula (Obr. 8), která se běžně používá jako zpomalovač hoření. Spotřeba TBBPA je 210 000 tun za rok, což z něj činí jeden z nejhojněji používaných bromovaných zpomalovačů hoření (Alaee et al., 2003). TBBPA je primárně používán jako reaktivní látka zpomalující hoření v epoxidových pryskyřicích a polykarbonátů, které se používají při výrobě desek plošných spojů. Asi 10% produkovaného TBBPA se používá jako přísada do různých dalších typů polymerů (Sjodin et al., 2003). Pokud je TBBPA používáno jako reaktivní složka, je začleněno do struktury polymeru a k jeho uvolnění dochází těžko. Avšak pokud je použito jen jako přísada, nestává se součástí struktury polymeru a může být uvolněn snadněji (Birnbaum et al., 2004). TBBPA byl pozorován na několika různých místech v životním prostředí. Nečastějším zdrojem emisí jsou odpadní vody z továren produkujících bromované zpomalovače hoření. Tento fakt byl prokázán Sellstrom and Jansson (1995), kteří zkoumali vzorky z řeky, která se nacházela v blízkosti továrny, kde bylo používáno TBBPA. Zpracovali vzorky z lokalit nacházejících se asi 2 km proti proudu a 5km po proudu od místa továrny. Koncentrace TBBPA byla asi 10krát vyšší ve vzorcích z lokalit nacházejících se po proudu než z lokalit nacházejících se proti proudu (proti proudu – 34 µg/g suché váhy; po proudu – 270 µg/g suché váhy). TBBPA bylo také nalezeno v řekách a mořských sedimentech v Japonsku (Watanabe et al., 1983) a ve splaškových kalech ve Švédsku a Kanadě (Sellstrom and Jansson, 1995; Lee H. and Peart E. T., 2002). TBBPA byl detekován i ve vzduchu a ve

vzorcích prachu. Sjodin et al (2003) měřili koncentraci TBBPA ve vzduchu uvnitř recyklačních zařízení pro elektronické spotřebiče a také na dalších místech, jako jsou počítačové opravy, továrny vyrábějící obvodové desky a kanceláře vybavené počítači. TBBPA bylo zjištěno ve všech vzorcích s nejvyšší koncentrací v recyklačních zařízeních. TBBPA bylo také nalezeno v prachu uvnitř televizí a to v poměrně vysoké koncentraci 240 mg/g (Takigami et al., 2008). Je velmi pravděpodobné, že prach je hlavním zdrojem, ze kterého se TBBPA může dostávat do lidského organismu. To že se TBBPA skutečně dostává do lidského organismu, bylo prokázáno studií Jakobsson et al. (2002), kteří vyšetřili skupinu počítačových techniků a zjistili přítomnost TBBPA u 8 z 10 vzorků krve. Dále bylo zjištěno, že TBBPA může být přepravováno skrze placentu k plodu a navíc bylo nalezeno v pupečnickové krvi lidí (Legler, 2008).

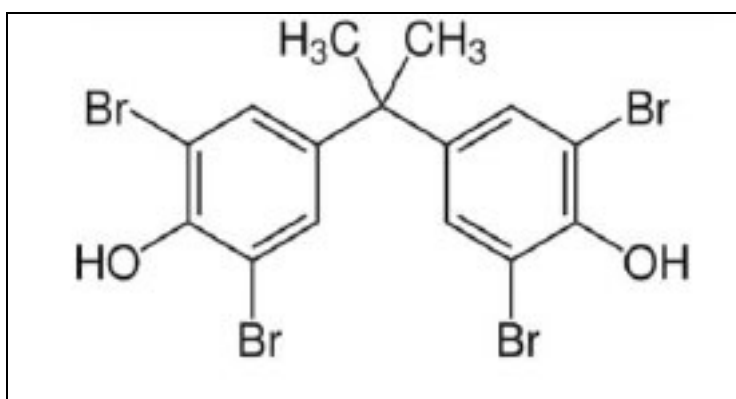
Bylo prokázáno, že TBBPA se může silně vázat na transportní protein hormonu štítné žlázy – transthyretin (TTR) *in vitro*. Funkce TTR je transportovat thyroxin (T4) a vitamin A. *In vitro* pokusy ukázaly, že TBBPA má stejnou i vyšší afinitu k TTR než samotný T4 (Meerts et al., 2000). Dále bylo prokázáno, že TBBPA inhibuje vazbu triodthyroninu (T3) na thyroidní (TH) receptor a také stimuluje proliferaci GH3 buněk (TH-dependentní hypofyzární buňky) (Fini et al., 2007; Kitamura et al., 2002). Nejen thyroidní systém může být narušen vlivem TBBPA, ale i estrogení hormonální systém může být ovlivněn. Bylo prokázáno, že TBBPA se může vázat na estrogení receptor *in vitro* (Korner et al., 1998) a také je schopen indukovat proliferaci estrogen dependentních MCF-7 (Samuelsen et al., 2001) a Mit/E2 buněk (Kitamura et al., 2002). Estrogení aktivita *in vivo* zatím nebyla prokázána.

In vitro studie prokázaly toxický vliv TBBPA na různé savčí buněčné linie (Strack et al., 2007). A studie Reistad et al. (2007) ukázala, že nízká koncentrace TBBPA způsobuje zvýšenou intracelulární koncentraci Ca^{2+} iontů u granulárních buněk mozečku. Tento jev byl pozorován i u TM4 Sertoliho buněk. Tyto buňky po vystavení μM koncentraci TBBPA také vykazovaly zvýšenou koncentraci intracelulárního Ca^{2+} a v důsledku toho došlo k jejich poškození a následné smrti. Dále byly u těchto buněk pozorovány dramatické změny v mitochondriálním membránovém potenciálu (Ogunbayo et al., 2008), autoři předpokládají, že tato změna membránového potenciálu může být způsobena právě zvýšenou koncentrací intracelulárního Ca^{2+} , který mitochondrie přijímají a dochází tak

ke zvýšení koncentrace Ca^{2+} v mitochondriích, která vede k depolarizaci mitochondriální membrány a k otevření mitochondriálních porů. Tímto může dojít k uvolnění různých pro-apoptotických faktorů a následně k buněčné smrti (Hom et al., 2007).

U krys vystavených účinkům TBBPA, byla zaznamenána zvýšená váha gonád a také byla ovlivněna cirkulace testosteronu v krvi samců F1 generace (Van der Ven et al., 2008). Tyto nálezy naznačují, že TBBPA by mohlo mít vliv i na androgenní hormonální systém.

TBBPA je strukturně velmi podobný endokrinnímu disruptoru bisphenolu A. Negativní vliv této látky na reprodukční parametry u myší byl, mimo jiné, prokázán v naší laboratoři (Peknicova et al., 2002). Vzhledem ke strukturní podobnosti těchto dvou látek a předešlým zjištěním lze předpokládat, že TBBPA má také negativní vliv na reprodukci savců.



Obr. 8 – Struktura tetrabrombifenolu A

1.3 Reprodukčně-toxikologické studie na myším modelu *in vivo*

Myš je jedním z nejčastěji používaným savčím modelem a některé výsledky lze porovnat s lidskými. Myší a lidský genom má přibližně stejnou velikost a stejný počet genů. Většina lidských genů má myší protějšek se stejnou nebo podobnou funkcí. Mutace zapříčiňující nemoci u lidí mají stejný efekt u myší a proto možné jejich studium na myším modelu. Tyto vlastnosti nalezneme u většiny savců, avšak myš má ještě další výhody, které z ní dělají ideální modelový organismus:

- Jednoduchá manipulace v laboratorních podmínkách
- Krátká generační doba (2 měsíce)

- Existence mnoha transgenních kmenů
- Existence inbredních a outbredních linií
 - Inbrední linie – geneticky identická (homozygotní) linie (C57BL/6)
 - Outbrední linie – geneticky různorodá (heterozygotní) linie, blízká lidské populaci (CD1)

Myší model je mimo jiné hojně využíván v toxikologických studiích, kdy je zjišťován vliv různých chemických látek na organismus – na jeho zdraví či reprodukce schopnost (reprodukčně-toxikologické studie). Pro tyto studie jsou využívány jak outbrední tak inbrední myší linie. Outbrední linie, jsou využívány proto, že jsou geneticky heterogenní a odrážejí tak vliv dané látky na reálnou populaci. Zatímco inbrední, geneticky homogenní linie, se lépe hodí pro genetickou analýzu a získané výsledky je snazší reprodukovat. Avšak inbrední kmeny reprezentují pouze jediný genotyp, proto generalizace výsledků na základě použití inbrední linie musí být velmi opatrná.

Další výhodou využití myší pro reprodukčně-toxikologické studie je jejich krátká generační doba, která umožňuje provedení multigeneračních studií. Při těchto studiích jsou myši vystaveny účinkům dané látky po dobu několika generací, což umožňuje určit, zda vliv dané látky je kumulativní či naopak je organismus schopen si na něj zvyknout nebo zda-li jsou vyvolané změny přenášeny na potomstvo (např. vlivem epigenetických mechanismů) či nikoliv.

1.4 Patologie samčí reprodukce po ovlivnění polutanty

Patologie samčí reprodukce způsobená působením polutantů životního prostředí může být různorodá. Proto se při toxikologických studiích hodnotí mnoho reprodukčních parametrů od váhy těla a jednotlivých orgánů po analýzu exprese jednotlivých genů hrajících roli během reprodukce.

Běžně se po působení polutantů vyskytuje snížená váha těla (Kyselova et al., 2004; Elzeinova et al., 2008) či reprodukčních orgánů jako jsou testes, prostata či semenné vaky (Kyselova et al., 2003; Kyselova et al., 2004; Yu et al., 2004; El-Dakdoky and Helal, 2007; Elzeinova et al., 2008). Někdy také dochází ke snížení anogenitální distance (Elzeinova et al., 2008) či ke snížení počtu potomků (Kyselova et al., 2003; Kyselova et al., 2004).

Dalším hodnoceným parametrem je kvalita spermií. Negativní vliv polutantů se také často projeví na sníženém počtu spermií (El-Dakdoky and Helal, 2007; Elzeinova et al., 2008), snížení jejich motility či viability (Yu et al., 2004; Elzeinova et al., 2008). Dále se vyskytuje zvýšený počet morfologicky abnormálních spermií jako na příklad – spermie s kulatými hlavičkami, spermie bez akrosomu či spermie s difusním barvením akrosomu (Elzeinova et al., 2008).

Velmi často také dochází k patologickým změnám v morfologii testes či epididymu. K posouzení těchto změn jsou využívány histologické studie, kdy je hodnocena struktura, průměr či tloušťka semenotvorných kanálků. Dále je hodnocen celkový průběh spermatogeneze či patologická hypertrofie testikulárních buněk (možno využít TUNEL analýzu), (Yu et al., 2004; El-Dakdoky and Helal, 2007; Elzeinova et al., 2008).

Analýza genové exprese je prováděna na genech, které mají úlohu v savčí reprodukci. Hodnocené geny jsou vybírány tak, aby charakterizovali jednotlivé kroky během spermatogeneze či aby odráželi funkčnost spermií. Mezi tyto geny patří na příklad gen pro preakrosin, který je nezbytný pro správnou funkci akrosomu či geny pro estrogení/ androgení receptor, které mohou odrážet estrogení/androgení aktivitu zkoumané látky. Často hodnocenými geny jsou geny pro proteiny patřící do rodiny proteinů tepelného šoku (Heat shock proteiny – Hsps). Hsps patří mezi stresové proteiny, takže mohou odrážet míru stresu, kterému jsou buňky vystaveny. Mezi těmito proteiny jsou i konstitutivně exprimované proteiny, které mají nezastupitelnou roli ve spermatogenezi, jejich exprese je vývojově regulována a jsou exprimovány v určitých fázích spermatogeneze (viz. výše). Jejich exprese tak může odrážet vliv dané látky na jednotlivé fáze spermatogeneze. Dalšími hodnocenými geny jsou geny pro proteiny hrající roli během apoptotického procesu, jako jsou B-cl2, Bax či p53 (Elzeinova et al., 2008).

2 Cíle práce

Cílem této práce bylo určit vliv tetrabrombifenolu A (TBBPA) na reprodukční parametry, spermatogenezi a aktivitu vybraných genů v *in vivo* studiích provedených na myším modelu. Efekt TBBPA byl zkoumán ve dvou *in vivo* studiích

- dvougenerační *in vivo* studie provedená na outbrední linii myší CD1
- jednogenerační studie provedena na inbrední myší linii C57BL/6 (BL/6)

Mimoběžně hodnocených parametrů jako jsou váha těla, váha orgánů, anogentitální vzdálenost, počet potomků a kvalita spermií, se tato práce zaměřuje na apoptotický stav testikulárních buněk a genovou expresi genů kódujících vybrané proteiny, které hrají důležitou roli během savčí spermatogeneze.

Dále bylo cílem práce porovnat výsledky získané z dvou *in vivo* studií provedených na různých myších liniích (outbrední linie vs inbrední linie).

3. Metody

3.1 Použité chemikálie a roztoky

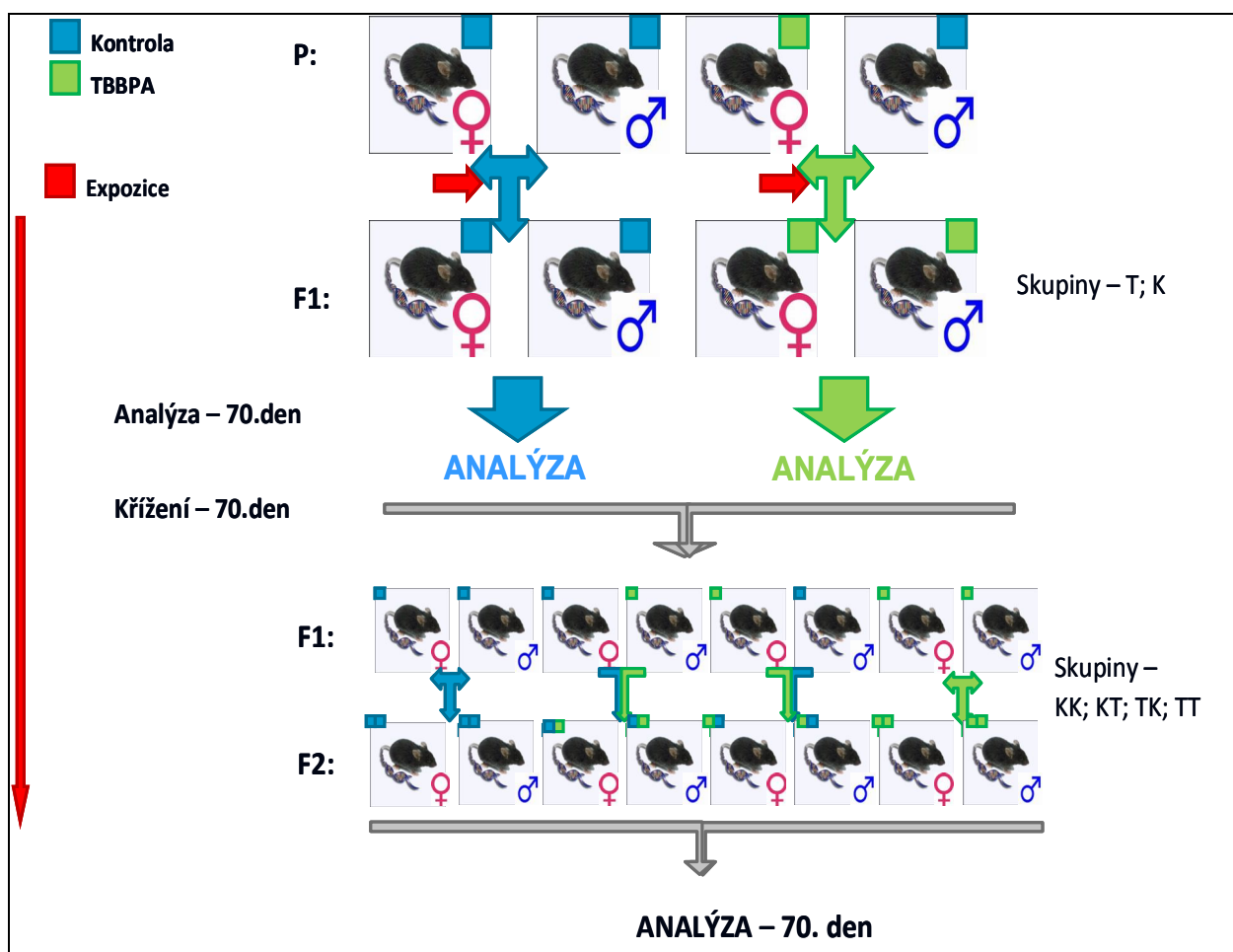
<i>0.05% Triton X-100</i>	- 10 μ l Triton X-100; 19.99ml PBS
<i>4% formaldehyd</i>	- 4ml formaldehyd; 96ml dH ₂ O
<i>50% ethanol</i>	- 50ml 100% ethanol; 50ml dH ₂ O
<i>70% ethanol</i>	- 70ml 100% ethanol; 30ml dH ₂ O
<i>80% ethanol</i>	- 80ml 100% ethanol; 20ml dH ₂ O
<i>96% ethanol</i>	- 96ml 100% ethanol; 4ml dH ₂ O
<i>Akrylamidový roztok</i>	- 14.85g akrylamid; 0.15g BIS; doplněno do 50ml dH ₂ O
<i>Blokovací roztok</i>	- 10 μ l Tween 20; 19.49ml PBS; 0.5ml želatina
<i>Blotovací roztok</i>	- 72g glycín; 15g Tris; 1l methanol; doplněno do 5l dH ₂ O
<i>Citrátový pufr</i>	- 0.9g NaCl; 0.44g citrátu sodného v 0.1 l dH ₂ O, pH 7.4
<i>Elektrodový pufr</i>	- 30.3g Tris; 14.4g glycín; 0.1g SDS; doplněno do 1l dH ₂ O
<i>Odbarvovací roztok</i>	- 35ml 100% ethanol; 10ml kyselina octová; 55ml dH ₂ O
<i>PBS 10x (koncentrovaný)</i>	- NaCl 175.4g ; 55.2g Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O; doplněno do objemu 2l destilovanou H ₂ O (dH ₂ O) pH 7.4 (upraveno NaOH; HCl)
<i>PBS-Tween</i>	- 10 μ l Tween 20; 19,99ml PBS
<i>Coomassie blue</i>	- 1.25g Coomassie blue; 35ml kyselina octová; 250ml ethanol, 215ml dH ₂ O
<i>roztok Eosinu</i>	- 1g Eosin; 100ml dH ₂ O
<i>roztok Haematoxilinu</i>	- 1g Haematoxin; 10ml 100% ethanol
<i>roztok Hoechst 33342</i>	- 1mg Hoechst 3342; 5ml citrátového pufru
<i>Sušící roztok</i>	- 5ml glycerol; 40ml 100% ethanol; 55 ml dH ₂ O
<i>TE pufr</i>	- 0.5ml 1M Tris (pH 7.6); 100 μ l 0.5M EDTA (pH 8); 50ml tkáňové H ₂ O)

3.2 Experimenty *in vivo*

Při prvním experimentu *in vivo* byla použita CD1 outbrední linie myší (An Lab Ltd). Tato linie se vyznačuje vysokou hetezygotností a početnými vrhy mláďat (12-13 mláďat na vrh). Myši (kontrolní a experimentální skupiny) byly chovány za standardních experimentálních podmínek – konstantní teplota a 12-ti hodinový světelný režim, v chovném a experimentálním zařízení Ústavu molekulární genetiky, AVČR, v. v. i., Praha. Zvířata byla krmena krmivem bez obsahu fytoestrogenů bezsójovým krmivem (Sniff Soest) a napájena perorálně at libidum. Veškeré vnější stresové faktory byly sníženy na minimum. Myši byly vystaveny vlivu TBBPA rozpuštěném ve vodě. Byla kalkulována denní dávka vody, kterou myši vypijí (5ml/den) a koncentrace TBBPA ve vodě byla zvolena tak, aby myš byla vystavena 1µg TBBPA denně (200µg/l). Rodičovská generace byla ve stáří 70 dnů křížena a od zabřeznutí byly samice vystaveny účinkům TBBPA (mimo kontrolních zvířat). Narozená mláďata – F1 generace, byla vystavena účinkům TBBPA (mimo kontrolních zvířat) od narození až do 70. dne, kdy byla zvířata usmrcena a použita na analýzu. Část zvířat z F1 generace byla ve stáří 70 dnů křížena a to podle diagramu, který je znázorněn na Obr.9.

Narozená mláďata – F2 generace, byla ovlivňována podle toho, zda byla ovlivněna matka, tzn. pokud matka byla vystavena účinkům TBBPA, tak i narozená mláďata byla ovlivňována a to od narození do 70. dne, kdy byla zvířata usmrcena a použita na analýzy. Pokud ovšem matka byla z kontrolní skupiny, tak narozená mláďata ovlivňována nebyla a to ani v případě, že otec byl vystaven účinkům TBBPA. I tato zvířata byla usmrcena ve věku 70 dnů a podrobena analýzám. Počet analyzovaných zvířat byl 20 pro každou skupinu.

Při druhém *in vivo* experimentu byl použit inbrední kmen myší C57BL/6 (BL/6) (AnLab). Myši byly chovány za stejných podmínek jako v předchozím případě a byly vystaveny účinkům TBBPA postnatálně ve stáří 30 – 45 dnů, tj. v období puberty (kritické období). Ovlivněná zvířata tvořila skupinu zvanou TBBPA a kontrolní skupina myší, která ovlivňována nebyla. Zvířata byla usmrcena ve stáří 70. dnů a použita na analýzu. Tato studie byla pouze jednogenerační.



Obr. 9 – Diagram křížení CD1 myší v dvougenerační *in vivo* studii. V parentální generaci nebyla zvířata vystavena účinkům TBBPA. Jejich křížením vznikly dvě skupiny (K, T) F1 generace. U skupiny **K** narozená mláďata nebyla ovlivňována látkou TBBPA. U skupiny **T** byla matka po zabřeznutí vystavena účinkům TBBPA stejně jako její narozená mláďata. Zvířata F1 generace byla křížena následujícím způsobem – matka i otec ze skupiny K, jejichž mláďata tvořila skupinu **KK** F2 generace; matka ze skupiny K a otec ze skupiny T, jejichž mláďata tvořila skupinu **KT** F2 generace; matka ze skupiny T a otec ze skupiny K, jejichž mláďata tvořila skupinu **TK** F2 generace; matka i otec ze skupiny T, jejichž mláďata tvořila skupinu **TT** F2 generace.

3.3 Váha těla a orgánů

Zvířata z kontrolní a experimentálních skupiny byla usmrcena ve stejném stáří a po jejich usmrcení byla změřena anogenitální vzdálenost (AGD) a zvážena hmotnost těla. Následně byly vypreparovány reprodukční orgány – testes, epididymy, semenné vaky a prostata. Vypreparované reprodukční orgány byly

separovány a očištěny a individuálně zváženy na analytických vahách. Jednotlivé váhy byly zapsány a podrobeny statistické analýze.

Testes byla zamražena a uchovávána při teplotě -70°C pro další analýzu a proximální část cauda epididymis byla použita k získání spermií (viz níže).

3.4 Příprava buněk

Spermie byly získány z proximální části levého a pravého cauda epididymys dospělých myší. Epididymy byly vloženy do 1000 μl vyhřátého PBS, zde byly nastříhány a spermie se nechaly vyplavit. Vyplavování probíhalo v CO_2 inkubátoru při teplotě 37°C po dobu 10-15 minut. Po vyplavení spermií do roztoku byl roztok odsát a přenesen do čisté zkumavky a doplněn do 1000 μl PBS. V případě vzorků získaných z CD1 *in vivo* studie bylo následně odebráno 10 μl buněčné suspenze k určení koncentrace spermií, 10 μl k určení životnosti spermií a 10 μl pro ohodnocení apoptotického stavu spermií. Zbývající buněčná suspenze byla použita pro přípravu mikroskopických preparátů. Buněčná suspenze byla centrifugována při 200g po dobu 15 minut a třikrát promyta v 5 ml PBS (pH7.4). Část promyté suspenze byla naředěna na koncentraci $1 \cdot 10^6/\text{ml}$ buněk a následně nakapány po 10 μl na podložní sklo. Vzniklé preparáty byly po zaschnutí skladovány při teplotě 4°C . Zbylá část suspenze byla centrifugována 15 minut při 200g a pelety byly zamraženy pro další zpracování.

V případě vzorků získaných z BL/6 *in vivo* studie byly vyplavené spermie centrifugovány při 200g po dobu 15 minut a promyty v 1ml PBS. Následně byl přidán formaldehyd pro dosažení finální koncentrace 4%. Po 10 minutové inkubaci při pokojové teplotě byla suspenze zmražena v 100% ethanolu.

3.5 Koncentrace spermií

K určení koncentrace spermií bylo odebráno 10 μl buněčné suspenze, která byla naředěna 100x na koncentraci vhodnou pro počítání v Bürkerově hemocytometrické komůrce. Do Bürkerovy komůrky bylo naneseno 10 μl naředěné suspenze a následně byly buňky spočítány pomocí světelného mikroskopu (Meopta) při 100-násobném zvětšení.

3.6 Určení životnosti spermii

K určení životnosti spermii bylo odebráno 10 μ l buněčné suspenze, která byla smíchána v poměru 1:1 s 0,2% glutaraldehydem v PBS (Fluka, Sigma-Aldrich). Směs byla po 5-ti minutové inkubaci při pokojové teplotě zředěna 5x v PBS (pH7.4). Následně bylo 10 μ l vzorku smícháno v poměru 1:1 s roztokem Hoechst 33342 (Sigma) v citrátovém pufru a inkubován v temnu 5 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci bylo 10 μ l suspenze nakapáno na podložní sklo, překryto krycím sklem a hodnoceno pod fluorescenčním mikroskopem Nikon E400 Eclipse s použitím objektivu 40x Nikon Plan 40/0.65. Buňky, u kterých došlo k fluorescenčnímu barvení hlavičky představují buňky mrtvé. Hodnoceno bylo vždy minimálně 200 buněk.

3.7 Hodnocení apoptotického stavu spermii

K hodnocení apoptotického stavu spermii byl použit kit APO-AF (Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit, Sigma). Pro analýzu byl použit upravený protokol a to: 100 μ l 1x koncentrovaného vazebného pufru (zásobní 10x), 1 μ l roztoku Annexinu V a 1 μ l buněčné suspenze. Připravený vzorek byl inkubován při pokojové teplotě 15 min v temnu. Po důkladném resuspendování bylo odebráno 2 x 10 μ l a nakapáno na podložní sklo a v temnu usušeno při teplotě 37°C. Po zaschnutí kapek bylo na kapky nanášeno montovací médium obsahující DAPI pro barvení jaderné DNA (Vectashield with Dapi, Vector Laboratories) s následným překrytím krycím sklem.

Takto připravené mikroskopické preparáty byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse E-400 a objektivu Plan Apo VC 60x oil. Jednotlivé snímky byly snímány pomocí CCD kamery VDS1300 (Vosskühler) a softwaru NIS -Elements AR (Laboratory Imaging).

3.8 Morfologie spermii

Pro hodnocení morfologického stavu myších spermii byla buněčná suspenze nakapána po 10 μ l na sklo, zafixována při teplotě 37°C a barvena podle protokolu pomocí Spermac Stain systému (Ferti Pro).

Jako další metoda hodnocení morfologického stavu spermií byla využita nepřímá imunofluorescence na preparátech značených monoklonálními protilátkami. Hodnoceno bylo vždy minimálně 200 buněk.

3.9 Nepřímá imunofluorescence

K ohodnocení akrosomální integrity spermií bylo použito značení pomocí monoklonálních protilátek proti intra-akrosomálním proteinům - Hs-8 a Hs-14. Tyto monoklonální protilátky byly vytvořeny v naší laboratoři (Peknicova et al., 2002; Peknicova et al., 2005).

Připravené preparáty (buněčná suspenze nakapaná po 10 μ l na podložní sklo, koncentrace buněk 1.10⁶/ml byly permeabilizovány pomocí acetonu při pokojové teplotě po dobu 10 minut a následně důkladně opláchnuty v PBS. Na preparáty byly nanесeny ředěné roztoky monoklonálních protilátek v PBS o finální koncentraci 20 μ g/ml. Preparáty byly inkubovány ve vlhké komoře přes noc při teplotě 4°C. Po inkubaci byla skla důkladně opláchnuta v PBS, nanесena FITC značená sekundární protilátka (Goat-Anti-Mouse IgM conjugated FITC, Sigma) ředěná 1:128 v PBS. Skla s nanесenou sekundární protilátkou byla inkubována ve vlhké komoře 60 minut při 37°C. Po ukončení inkubace byla skla promyta v PBS a následně v destilované vodě. Po rychlém osušení bylo na buňky aplikováno montovací médium s DAPI k označení jaderné DNA (Vectashield with DAPI, Vector Laboratories).

Takto připravené mikroskopické preparáty byly hodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse E-400 a objektivu Plan Apo VC 60x oil. Jednotlivé snímky byly snímány pomocí CCD kamery VDS1300 (Vosskühler) a softwaru NIS Elements AR (Laboratory Imaging).

3.10 Příprava buněčných suspenzí

Pravé testes bylo homogenizováno (Precellys 24, Bertin Technologies) v 1ml PBS vzniklá suspenze byla následně přefiltrována přes filtr s velikostí pórů 70 μ m a byl přidán formaldehyd pro dosažení finální koncentrace 4%. Po 10 minutové inkubaci při pokojové teplotě byla suspenze zmrazena v 100% ethanolu.

3.11 Histologie

Na histologickou analýzu bylo použito pravé testes samců z kontrolních i experimentálních skupin. Testes byla fixována v 4% formaldehydu po dobu 48 hodin a následně promyta ve vodě po dobu 15 minut. Fixovaná tkáň byla dehydratována v koncentrační řadě ethanolu (EtOH) následujícím způsobem – 70% EtOH, 80% EtOH a 96% EtOH a v každém roztoku byla fixovaná tkáň ponechána 1 hodinu. Dehydratovaná tkáň byla inkubována 30 minut v roztoku acetonu a xylenu v poměru 1:1 a následně v xylenu 30 minut a nakonec byla tkáň zalita do parafinu (Paraplast, Sigma). Tkáň zalitá do parafinu byla řezána mikrotomem na řezy o tloušťce 15-20 μ m, které byly následně umístěny na vyhřáté podložní sklíčko a nechaly se na něj přilnout.

Aby mohla být provedena histologická analýza musely řezy být nejprve zbaveny parafínu. Odparafinování se provádělo pomocí xylenu (3x10 minut), následně byly vzorky rehydratovány v koncentrační řadě EtOH (96%, 80%, 70%, 50% EtOH každý po dobu 5 minut) a nakonec v destilované vodě po dobu 5 minut.

Po rehydrataci byly vzorky barveny 10 % roztoku Haematoxin Harris v ethanolu po dobu 10 minut pro obarvení buněčných jader. Následovalo barvení 1% Eosinem v destilované vodě po dobu 5 minut, po kterém byly vzorky zality do Kanadského balzámu. Histopatologický stav testikulární tkáně byl hodnocen pod světelným mikroskopem (Olympus BX41, zvětšení 400x). Bylo hodnoceno 10 semenotvorných kanálků u pěti řezů pro každé experimentální zvíře. Byly hodnoceny následující parametry: integrita tkáně; počet Leydigových buněk; rozložení spermatogonií v zárodečné vrstvě a přítomnost spermatogonií v lumen semenotvorných kanálků. Fotografie byly pořízeny kamerou Olympus IX81 při 600x zvětšení.

3.12 TUNEL analýza na histologických řezech testes

TUNEL analýza je metoda, která umožňuje detekovat apoptotické buňky, tak že značí fragmentaci DNA. Ke značení Fragmentace DNA dochází inkorporováním fluoresceinem značených nukleotidů na 3'-OH konce DNA převisů.

TUNEL analýza byla provedena na histologických řezech testes pomocí kitu (Promega Co). Histologické řezy byly odparafinovány (viz výše) a fixovány v 4% formaldehydu v PBS 4 minuty při pokojové teplotě. Následně byly dvakrát promyty v PBS (pokaždé 5 minut), permeabilizovány v 0,05% roztoku Triton X-100 v PBS po dobu 5 minut a opět dvakrát promyty v PBS.

V každém experimentu byl jeden vzorek použit jako pozitivní kontrola. Tento vzorek byl inkubován ve 100ml Dnase I pufru (Fermentas) a následně inkubován po dobu 10 minut ve 100ml Dnase I pufru obsahujícím 1 jednotku/ml enzymu Dnase I (Fermentas).

Experimentální řezy byly ekvilibrovány 15 minut při pokojové teplotě ve 100ml ekvilibračního pufru. Následně byly experimentální řezy i řezy představující pozitivní kontrolu inkubovány v 50 ml TdT inkubačním pufru, který obsahoval 45 ml ekvilibračního pufru, 5 ml nukleotidového mixu a 1 ml TdT enzymu (terminální deoxynukleotidyl transferáza). Negativní kontrola byla ošetřena stejným způsobem jako experimentální vzorky s tím rozdílem, že místo TdT enzymu byl přidán 1ml sterilní destilované vody. Vzorky byly inkubovány ve vlhké komůrce po dobu 60 minut v termostatu (37°C). Po této inkubaci byly vzorky promyty 3x v PBS a 3x v destilované vodě (každé promytí – 5 minut). Nakonec byly všechny vzorky osušeny a bylo na ně nanесeno montovací medium s DAPI (Vectashield with DAPI; Vector Laboratories)

Vzorky byly hodnoceny v Nikon E400 Eclipse fluorescenčním mikroskopu s použitím objektivu 40x Nikon Plan 40/0.65 a fotografovány kamerou VDS1300 (Vosskühler) s pomocí softwaru pro zpracování obrazu NIS Elements AR (Laboratory Imaging Ltd.). V každém řezu byly počítány TUNEL pozitivní buňky v deseti semenotvorných kanálcích. Pro každou experimentální a kontrolní skupinu byly hodnoceny nejméně čtyři vzorky a při každém experimentu byla provedena pozitivní a negativní kontrola.

3.13 Detekce genové exprese

Nejprve byla z testikulární tkáně získána celková RNA, která byla reverzní transkripcí přepsána do cDNA. Získaná cDNA byla použita na detekci genové exprese vybraných genů pomocí metody Real Time PCR za použití specifických primerů.

3.13.1 Izolace RNA

K izolaci RNA byl použit kit – Tri Reagent (Sigma T 9424). RNA byla izolována z levého testes CD1 myši k němuž bylo přidáno 1ml Tri reagentu a následně byla tkáň zhomogenizována v homogenizátoru (Precellys 24, Bertin Technologies). Po homogenizaci následovala 5-ti minutová inkubace při pokojové teplotě (RT). Dále bylo přidáno 0,1 ml Bromchlor propanu a inkubováno 15 minut při RT. Vzniklá směs byla centrifugována 15 minut při 12000g a 4°C. Centrifugace vzorek rozdělí na tři fáze (spodní červená – proteiny, střední – DNA a horní vodná fáze – RNA).

Horní vodná fáze byla přenesena do sterilní zkumavky (zbytek vzorku byl uchován na ledu pro izolaci proteinů), bylo přidáno 0.5ml isopropanolu a centrifugováno při 12000g; 10 minut; 4°C. RNA precipitát utvořil peletu na dně a boku zkumavky. Supernatant byl odstraněn a peleta byla promyta v 1ml 75% ethanolu. Následovala centrifugace při 7500g; 5 minut; 4°C. Vzniklý supernatant byl odstraněn a peleta byla sušena 5-10 minut na vzduchu v sterilním boxu (PCR box, BioTech). Po vysušení byla peleta rozpuštěna v 40 μ l Rnase free water (Fermentas) a skladována v -70°C.

Izolace RNA byla provedena zvlášť pro každého jedince ze všech skupin I. a II. generace. V případě BL/6 myši byla RNA izolována z poloviny levého testes. Postup izolace se lišil pouze v použitých objemech, které byly vždy poloviční.

3.13.2 Stanovení celkového množství RNA

Celkové množství a čistota RNA bylo stanoveno spektrofotometricky na spektrofotometru (Helios α , Thermo Elektron Corporation). Koncentrace byla měřena při 260nm (A_{260}) a při 280nm (A_{280}). Při A_{260} dochází k měření koncentrace RNA, DNA zatímco při A_{280} dochází k měření koncentrace proteinů. Poměr A_{260}/A_{280} vypovídá tedy o čistotě vzorku a tento poměr by měl být pod hodnotou 1.7. Množství RNA bylo měřeno při A_{260} a z této hodnoty byla vypočítána koncentrace RNA v daném vzorku

Na spektrometrii byl roztok RNA 50x naředěn v TE pufru a absorbance vzorků byla měřena v kyvetách (ChromSpec). Veškerá práce s RNA probíhala za sterilních podmínek v PCR boxu (BioTech).

3.13.3 Reverzní transkripce (syntéza cDNA)

Pro syntézu cDNA bylo použito 5µg vyizolované RNA. Do 5-ti µg RNA byl přidán 1µl Dnasy I (Invitrogen); 1µl Dnasy I reakčního pufru (Fermentas) a objem byl doplněn H₂O (fermentas) do objemu 10µl. Výsledná směs byla inkubována 30 minut při 37°C v termocycleru (Techne Touchgene Gradient PCR Thermal Cycler, Labrecyclers). Tento krok slouží k odstranění DNA ze vzorku. Po 30-ti minutách byl ke směsi přidán 1µl EDTA (Fermentas) a následovala inkubace při 65°C po dobu 10 minut. EDTA chelatuje RNA a zabraňuje tak její hydrolýze při zahřívání. Po tomto kroku bylo k vzorku přidáno 30µl směsi, která obsahovala 8µl reakčního pufru pro M-MuLV reversní transkriptasu (Fermentas); 5µl 10mM 4dNTP (Fermentas), 0.3µl Inhibitoru RiboLock (Fermentas); 1µl oligo(dT) + náhodných primerů (Promega) a 15.2µl H₂O. Směs byla inkubována v termocycleru nejprve 60 minut při 42°C a následně 10 minut při 70°C. Po ukončení reakce následovalo zchlazení směsi na 4°C a výsledná cDNA byla skladována při -20°C.

V důsledku velkého množství vzorků byla RNA, která byla získána z testes zvířat stejné skupiny smíchána a na reverzní transkripci a následně Real Time PCR byly použity tyto směsi. Výjimkou bylo určování genové exprese genů Bax a Bcl-2v tetstikulární tkáni u BL/6 myší, zde byla reverzní transkripce a následně Real Time PCR provedena pro každého jedince zvlášť, aby bylo možné získaná data korelovat s daty získanými z Caspase 3 assay (viz níže).

3.13.4 Real Time PCR (RT PCR)

Na RT PCR byla použita 5x ředěná cDNA a 10x naředěné primery. Použité primery viz. Tabulka 1. RT PCR bylo provedeno ve stripech (PCR strips, BioRad) a veškerá práce byla provedena sterilně v boxu (PCR box, BioTech). Na jednu reakci bylo použito 2µl 5x ředěné cDNA; 10µl SYBR Green Master Mix (Fermentas); 0.5 µl primeru a 7µl H₂O. Všechny reakce byly provedeny v dupletech v termocycleru (Eppendorf). Reakce probíhala podle postupu, který je znázorněn v tabulce 2.

Z naměřených CT hodnot bylo vypočítáno relativní množství mRNA v každém vzorku, kdy kontrola byla stanovena na 100% a experimentální vzorky byly vztahovány ke kontrole (Vzorky z F1 generace byly vztahovány ke kontrolní skupině z F1 generace – K; a vzorky z F2 generace byly vztahovány ke kontrole z F2 generace – KK). Pro optimalizaci naměřených hodnot byly použity hodnoty naměřené pro gen PPIA – peptidylprolyl isomerase A, což je referenční gen (tzv. „housekeeping gen“), jehož exprese je v buňkách neměnná a proto se běžně se používá při PCR analýzách (Mamo et al., 2007; Ren et al., 2010).

gen	nukleotidová sekvence	velikost produktu PCR (bp)
Acr	5' -cacgtgtggacctcattgac- 3' 5' -gtagtcccaggtggctgtgt- 3'	248
Ar	5' -ggaccatgttttaccatcg- 3' 5' -tcgtttctgctggcacatag-3'	171
Apg-1	5' -gtcagaccttcccctgaaca- 3' 5' -gctccttgactgcaggaatc- 3'	215
Hsp60	5' -cttcaggggtgtcacaggt- 3' 5' -atctattgccaaggagggt- 3'	137
HspA1L	5' -cctgaccaaggaggagattg- 3' 5' -tccttcagaccctcatcacc- 3'	153
Hsp70-2	5' -gcgccctacccaactagata- 3' 5' -gatctccaccttgccatgtt- 3'	145
Bax	5' -gctgcagacatgctgtggatc- 3' 5' -tcacagccaggagaatcgcac- 3'	165
Bcl-2	5' -accgtcctgacttcacacag- 3' 5' -cgtgtgcagatgccggtcca- 3'	173
PPIA	5' -agctctgagcactggagaga- 3' 5' -gccaggacctgtatgcttta- 3'	158

Tabulka 1 – Sekvence použitých primerů

Krok	Teplota °C	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	10 min	1
Denaturace	95	15 s	40
Annealing	60	30 s	40
Prodlužování	72	30 s	40

Tabulka 2 – jednotlivé kroky RT PCR

3.14 Imunodetekce vybraných Heat shock proteinů

Nejprve byly izolovány proteiny z testikulární tkáně CD1 myši pomocí kitu Tri Reagent (Sigma). Vyizolované proteiny byly rozděleny v polyakrylamidovém gelu dle jejich velikosti a následně byl proveden přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na PVDF membránu na které byla následně provedena imunodetekce za použití monoklonálních protilátek proti daným proteinům.

3.14.1 Izolace proteinů

Izolace proteinů byla provedena pomocí kitu Tri Reagent (Sigma). Proteiny byly vyizolovány z levého testes každého experimentálního zvířete. Nejdříve byla testes homogenizována a byla izolována RNA (viz výše). Po odebrání horní vodné fáze bylo ke zbytku směsi přidáno 0.3ml 100% ethanolu (EtOH) a směs byla resuspendována, následovala centrifugace při 2000g; 5 minut; 4°C. Supernatant byl odsát, bylo k němu přidáno 1.5ml isopropanolu a následovala inkubace 5 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byl vzorek centrifugován při 12000g; 10 minut; 4°C. Supernatant byl odstraněn a peleta byla 3x promyta ve 2ml 0.3M guanidinium hydrochlorid/95% EtOH. Během každého promytí byla peleta inkubována 20 minut v promývacím roztoku a centrifugována při 7500g; 5 minut; 4°C. Po třetím promytí byla peleta resuspendována ve 2ml 100% EtOH a rozmixována. Po té následovala 20-ti minutová inkubace při pokojové teplotě. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány při 7500g; 5 minut; 4°C. Peleta byla zbavena supernatantu a sušena na vzduchu ve sterilním boxu (PCR box, BioTech), rozpuštěna v 1% SDS a následně centrifugována při 1000g; 10 minut; 4°C. Supernatant byl přenesen do čistých zkumavek a skladován při -70°C.

3.14.2 Měření koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla měřena na přístroji Qubit Fluorometer (Invitrogen) pomocí kitu Quant-iT protein assay. Pro měření byla vytvořena kalibrační křivka pomocí standardů o koncentraci 0 – 200 – 400ng/μl v poměru 10μl roztoku standardu a 190 μl ředícího pufru. Pro přípravu vzorků bylo použito poměru 1μl vzorku a 199μl ředícího pufru. Ředící pufr byl připraven v poměru 199 dílů ředidla a 1 díl Quant-iT protein reagentu. Připravené standardy a vzorky byly jemně rozmiksovány po dobu 3 sekund a následně inkubovány v temnu 15 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byla nejprve pomocí připravených standardů vytvořena kalibrační křivka a naměřené hodnoty vzorků byly přepočítány na koncentraci mg/ml.

3.14.3 Proteinová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Pro separaci proteinů byla použita vertikální elektroforéza Mini-Protean 4 (BioRad) a 15% polyakrylamidový gel (SDS-gel) podle Laemmliho (1970). Tloušťka gelu byla 1 mm. Na jeden gel bylo použito – 1.2ml destilované H₂O; 2.5ml akrylamidového roztoku; 1,3ml TRIS (1.5M; pH 8.8); 0,05ml SDS (10%); 0,05ml APS (10%); 0,002μl TEMED. Po nalití SDS-PAGE byl gel převrstven 500μl deionizované vody pro zabránění vysychání a nerovnoměrné polymerizaci gelu a gel byl polymerizován po dobu 30 minut. Následně byl připraven tzv. zaostřovací, 4% SDS-gel – 2.1ml destilované H₂O; 0.5ml akrylamidové směsi; 0.38ml Tris (1M; pH 6.8); 30μl SDS (10%); 30μl APS (10%); 3μl TEMED. Mezi elektroforetická skla byl vložen 15-ti jamkový hřebínek, který zde byl ponechán, dokud 4% gel nezpolymeroval.

Následně byly připraveny proteinové vzorky. Koncentrace celkového množství proteinů odpovídá množství 10μg na dráhu. Odpovídající množství buněčného lyzátu byla doplněna do celkového objemu 10μl a to 2x koncentrovaným SDS vzorkovým pufrem s β-merkaptoetanolen o výsledné koncentraci 5% v pufru (Laemmli, 1970; Laemmli et al., 1970) Výsledná směs byla inkubována 5 minut při 99°C (Mixing Block, Bioe) a po té centrifugována 5 minut při teplotě 4°C a 150g. Takto připravené vzorky byly nanášeny na gel spolu s proteinovými standardy firmy Bio-Rad

Elektroforetická separace proteinů probíhala při konstantním elektrickém proudu (16mA na každý gel) v elektrodovém pufru. Po dokončení elektroforetické separace byly gely opatrně vyjmuty, propláchnuty v deionizované vodě pro zbavení zbytků elektrodového pufru a barveny roztokem Coomassie blue nebo použity k přenosu proteinů na PVDF membránu (Western blotting).

3.14.4 Barvení gelů pomocí Coomassie blue

Gely s rozdělenými proteiny byly barveny 1 hodinu v barvicím roztoku Coomassie blue, poté byly promývány v odbarvovacím roztoku, dokud nedošlo k odbarvení pozadí a nebyly patrné jednotlivé proteinové proužky. Následně byly gely přeneseny do sušícího roztoku na dobu 30 minut a po té usušeny mezi vrstvami celofánu s využitím sušícího rámečku

3.14.5 Přenos proteinů na PVDF membránu

Po elektroforetickém rozdělení proteinů byly gely opláchnuty v deionizované vodě, přeneseny do blotovacího pufru a zde ekvilibrovány 15minut. Po ekvilibraci byly gely vloženy mezi dvě PVDF membrány (Milipore), které byly před použitím smočeny v 100% methanolu a 15 minut ekvilibrovány v blotovacím transferovém pufru. Gely s PVDF membránami byly vloženy mezi 3 vrstvy chromatografického papíru (Whatman chromatography paper, Schleicher&Schuell). Chromatografický papír byl před použitím smočen v blotovacím pufru. Celá tato souprava byla vložena do blotovacího zařízení a za působení elektrického proudu došlo k přenosu proteinů na membránu. Přenos probíhal v přístroji Biorad Mini-transblot modul při konstantním proudu 0.5A 1 hodinu a 40 minut při teplotě 4°C.

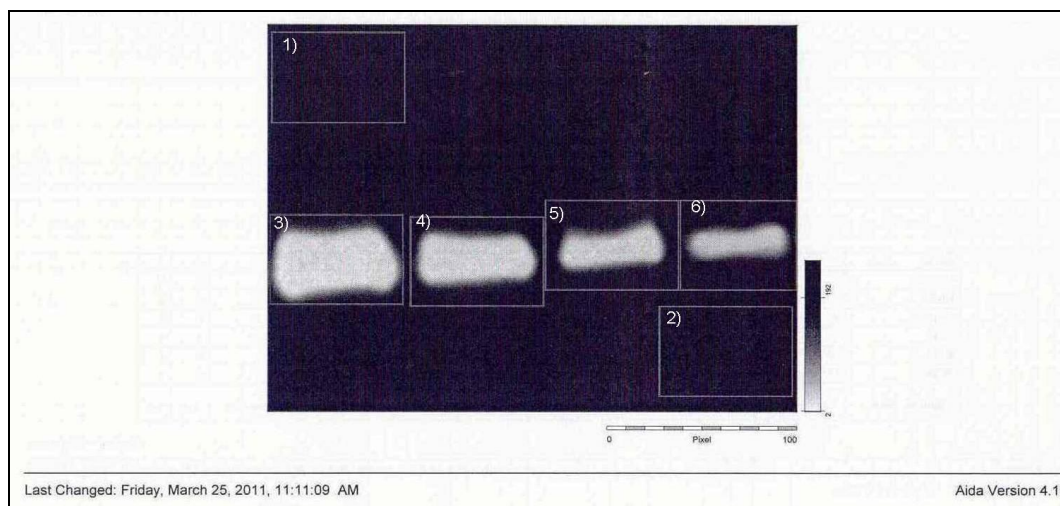
3.14.6 Imunodetekce pomocí specifických protilátek

Po elektrickém přenosu proteinů byly membrány propláchnuty v roztoku PBS-Tween a následně přeneseny do blokovacího roztoku, kde byly ponechány 2 hodiny při současném třepání. Po blokaci membrány byly aplikovány primární protilátky ředěné v roztoku 1% želatiny v PBS-Tween. Použité primární protilátky byly ředěné v následujících poměrech – Hsp70-2 (Abnova) 1:200; Hsc70t (Abcam) 1:200; Hsp60 (Abcam) 1:200. Jako pozitivní kontrola byla použita protilátka proti

cytoskeletálnímu proteinu α -tubulin (klon DM1A, Sigma), která byla ředěna v poměru 1:5000. Membrána byla v roztoku primární protilátky inkubována přes noc při teplotě 4°C za současného třepání. Po inkubaci s primární protilátkou byla membrána 6x promyta v promývacím roztoku (PBS; 0,05% Tween) a to pokaždé po dobu 10 minut. Následně byla aplikována sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou (Goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugate, Bio-Rad), která byla naředěna v poměru 1:3000 v roztoku 1% želatiny v PBS-Tween. Membrána byla inkubována s roztokem sekundární protilátky po dobu 60 minut při pokojové teplotě za současného třepání. Následně byly membrány opět promyty v promývacím roztoku (6x 10 minut) a poté inkubovány v chemiluminiscenčním substrátu SuperSignal (Pierce) 3 minuty. Po odsátí SuperSignálu byly RTG kazety s umístěnými membránami dále zpracovávány v temné fotografické komoře za použití filmů pro rentgenografii Medix XBU (Foma Bohemia). Pro další zpracování filmů byly použity chemikálie firmy Eastman Kodak.

3.14.7 Kvantifikace detekovaných proteinů

Výsledky imunodetekce byly kvantifikovány pomocí denzitometrického softwarového programu AIDA (Advanced Image Data Analyzer, Raytest). Pro kvantifikaci množství detekovaného proteinu byla vytvořena kalibrační křivka za pomoci kontrolní skupiny a pozadí. Detekce v kontrolních skupinách bylo stanoveno jako 100%, pozadí jako 0% a ostatní skupiny byly k tomuto množství vztahovány. Příklad měření je uveden na Obr.10.



Obr. 10 – Příklad kvantifikace detekovaných proteinů programem AIDA; 1) Standard – 0% proteinu; 2) Pozadí; 3) Standard – 100% proteinu (kontrolní skupina); 4) Experimentální vzorek (skupina KT z F2 generace) – 70% proteinu; 5) Experimentální vzorek (skupina TK z F2 generace) – 45% proteinu; 6) Experimentální vzorek (skupina TT z F2 generace) – 32% proteinu

3.15 Stanovení aktivity enzymu kaspasa 3

K určení aktivity enzymu kaspasa 3 byl použit kit Caspase 3 Assay (Sigma). Tento kit je založen na hydrolýze peptidového substrátu acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide enzymem kaspasa 3. Tato hydrolýza zapříčiní uvolnění p-nitroanilinu (pNA). Množství uvolněného pNA lze měřit kolorimetricky při vlnové délce 405 nm. Všechny použité reagensie byly součástí kitu.

Pro Caspase 3 Assay byla použita testikulární tkáň BL/6 myši. Byla použita polovina levého tetstes, ke které bylo přidáno 300μl lyzačního pufru a následně byla zhomogenizována v homogenizátoru (Precellys 24, Bertin Technologies). Po homogenizaci následovala centrifugace při 17 000g po dobu 15-ti minut, supernatant byl převeden do čisté zkumavky. Část byla ihned analyzována a část zamražena v tekutém dusíku a po té skladována při -70°C.

Caspase 3 Assay byla provedena v 96-ti jamkových destičkách. Do každé jamky bylo přidáno 20μl lyzátu; 70μl 1x assay buffer a 10μl substrátu. Reakce byly prováděny v dubletech a ke každé reakci byla provedena doplňující reakce s přidáním 10μl kaspasa 3 inhibitoru. Následně byla destička překryta Parafilmem (Sigma) a inkubována přes noc při teplotě 37°C. Po inkubaci byly vzorky měřeny kolorimetricky při 405 nm pomocí Biotrak II Plate Reader (Amersham). Naměřené

hodnoty byly použity k určení aktivity enzymu kaspasa 3 v jednotlivých vzorcích a hodnoty získané ze vzorků, kde byl přidán inhibitor byly použity jako kovariát při statistickém vyhodnocování.

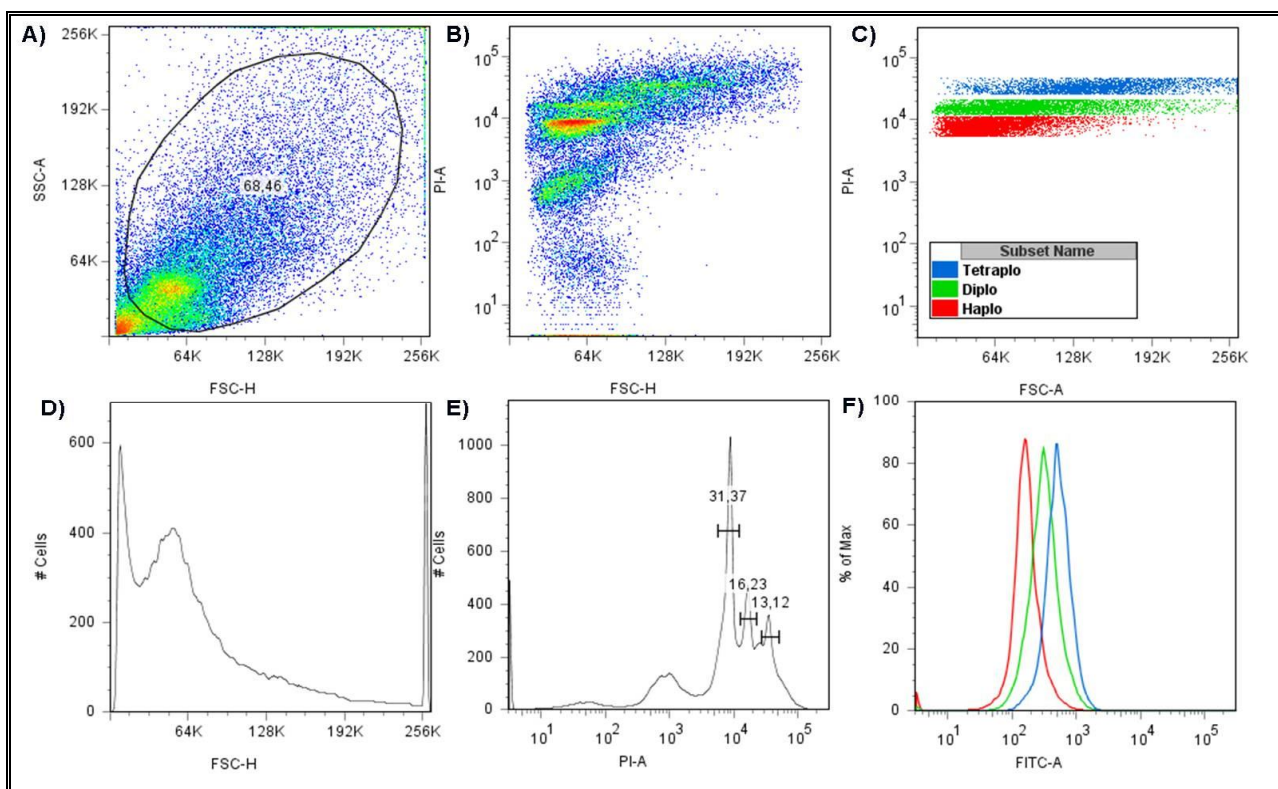
Caspasa 3 assay byla provedena pro každého jedince zvlášť a získané hodnoty byly následně korelovány s daty získanými z Real Time PCR provedeného s primery pro geny Bcl-2 a Bax (viz výše).

3.16 Stanovení apoptotických buněk pomocí průtokové cytometrie

Ke stanovení množství apoptotických buněk pomocí průtokové cytometrie byl použit kit (APO-BRDU, Sigma). Tento kit využívá dvojího barvení k detekci apoptotických buněk pomocí průtokové cytometrie. Pomocí propidium iodidu je barvena jáderná DNA a pomocí enzymu terminální TdT (enzym, který inkorporuje Br-dUTP na 3' konce DNA zlomů) a následného použití anti-Br-dUTP fluorescenčně barvené monoklonální protilátky jsou označené apoptotické buňky. Všechny použité reagenty byly součástí použitého kitu.

Do 1.5 ml zkumavky bylo přesunuto cca 1×10^6 buněk zamrazených v ledovém ethanolu a centrifugováno 5 minut při 400g. Vzniklá peleta byla resuspendována v promývacím roztoku a opět centrifugována. Tento krok byl opakován ještě jednou a vzniklá peleta byla resuspendována v 50-ti μ l DNA značícího roztoku, který se skládal z -10 μ l reakčního pufru; 0.75 μ l TdT enzymu; 8 μ l Br-dUTP a 32.25 μ l destilované H₂O. Do negativní kontroly nebyl přidán enzym TdT. Vzniklá směs byla inkubována 60 minut při 37°C, po inkubaci byl přidán 1ml Rinsing pufru a následovala centrifugace při 300g po dobu 5-ti minut. Tento krok byl opakován ještě jednou a vzniklá peleta byla resuspendována v 100 μ l roztoku obsahujícím protilátku - 5 μ l Anti-BrDU a 100 μ l Rinsing pufru. K pozitivní kontrole byly ještě přidány 2 μ l Dnasy I (Fermentas), (naštěpení DNA). Vzniklá směs byla inkubována 30 minut v temnu při pokojové teplotě. Po inkubaci bylo přidáno 0.5ml Propidium iodide/Rnase A roztoku a následovala inkubace po dobu 30-ti minut v temnu při pokojové teplotě. Po inkubaci byly vzorky hodnoceny na průtokovém cytometru BD LSR II (BD, Becton Drive Franklin Lakes); 488 nm excitační laser; emisní filtr 530/40; měření fluorescenční intenzity v kanálu FITC. Analýza byla provedena pomocí FlowJo 7.5.4. software (TreeStar Inc).

Tímto způsobem bylo určeno množství apoptotických buněk v buněčné suspenzi vytvořené z testes BL/6 myší a v suspenzi epididymálních spermií získaných z cauda epididymis BL/6 myší. Na Obr.11 je patrný průběh měření pro testikulární buněčnou suspenzi.



Obr. 11 – Průběh měření testikulární buněčné suspenzi na průtokovém cytometru; A) Celkové spektrum měřených buněk. Buňky jsou vyneseny v grafu kde osa x představuje komplexitu buňky a osa y její velikost.; B) Na grafu jsou vyneseny buňky pozitivní v propidium iodidu a již zde jsou patrné jednotlivé subpopulace; C) Vyznačení jednotlivých buněčných subpopulací – tetraploidní, diploidní a haploidní populace; D) Histogram velikosti měřených buněk – vyšší a užší křivka představuje buněčný dendrit, zatímco druhá křivka představuje měřené buňky; E) Histogram pro intenzitu značení propidium iodidem, kde jednotlivá čísla udávají intenzitu značení v procentech. Jednotlivé křivky odpovídají určitým buněčným subpopulacím – 31,37 % tetraploidní buňky, 16,23 % diploidní buňky a 13,12 haploidní buňky; F) Tento histogram ukazuje intenzitu značení pomocí TUNEL v jednotlivých subpopulacích po odečtení pozadí (přesvit propidium iodidu).

3.17 Statistická analýza

Statistická analýza získaných dat byla provedena v programu STATISTICA 7.0 (Statsoft). Počet potomků byl v první generaci analyzován Mann-Whitney U-testem, v druhé pak Kruskal-Wallis ANOVA. Post hoc analýza v druhé generaci byla provedena za použití MCMR. Váha těla a orgánů byla srovnávána metodou analýzy rozptylu (ANOVA), post hoc analýza byla provedena za použití Newman-Keuls testu. Váha jednotlivých orgánů byla srovnávána metodou analýzy kovariance (ANCOVA), jako kovariát byla použita váha těla. Data z analýzy spermií a metody TUNEL byla analyzována pomocí Kruskal-Wallis ANOVA, post hoc analýza byla provedena opět za pomoci MCMR. Rozdíly v expresi genů a aktivitě kaspasy 3 byla analyzována metodou ANOVA, post hoc analýza byla provedena za použití Newman-Keuls testu. Pro zjištění korelace mezi jednotlivými sety dat byl vypočítán Pearsonův korelační koeficient (r). Hodnota P menší než 0.05 byla označena za statisticky signifikantní. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4. Výsledky

4.1 Výsledky *in vivo* studie provedené na CD1 myších

První část se zabývá výsledky z dvougenerační studie provedené na kmenu outbredních CD1 myší *in vivo*.

4.1.1 Počet potomků, váha těla a orgánů

Prvními hodnocenými parametry byl počet potomků dále váha těla a jednotlivých orgánů. Srovnávání byli jedinci ze skupiny TBBPA z F1 generace s kontrolní skupinou (K) rovněž z F1 generace. A dále byli srovnávání jedinci skupin F2 generace (TT, KT, TK) s kontrolní skupinou (KK) taktéž z F2 generace. Tento postup byl použit u všech následujících měření.

TBBPA neměl žádný vliv na počet potomků v F1 ani v F2 generaci. Poměr samců a samic ve vrhu rovněž nebyl signifikantně ovlivněn (Tabulka 3).

Anogenitální vzdálenost (AGD) a hmotnost těla také nebyly ovlivněny u obou generací. Hmotnost testes byla signifikantně snížena ve skupině TT z F2 generace. U této skupiny byla rovněž pozorována zvýšená hmotnost prostaty a semenných vaků. Dále byla zaznamenána signifikantně zvýšená váha epididymu u zvířat skupiny KT z F2 generace. Hmotnost ostatních měřených orgánů (testes, prostata, semenné vaky) této skupiny se nelišila v porovnání se skupinou kontrolní. U skupiny TBBPA z F1 generace nebyla zaznamenána žádná signifikantní změna ve váze orgánů v porovnání s kontrolou. Stejně tak tomu bylo u skupiny TK z F2 generace. Všechny výsledky jsou shrnuté v Tabulce 4.

Skupina	Samci	Samice	Celkem
K	4.83±1.72	4.67±2.42	9.50±1.97
T	4.50±1.38	4.83±0.98	9.33±1.97
KK	4.25±1.26	4.50±1.00	8.75±0.96
KT	4.83±1.83	5.83±1.47	10.67±1.97
TK	3.00±0.00	5.67±1.53	8.67±1.53
TT	3.20±1.48	6.80±1.92	10.00±2.12

Tabulka 3 – Počet potomků. Mean±SD. N=20.

Skupina	AGD (cm)	Váha těla (g)	Testes (mg)	Prostata (mg)	Semenné vaky (mg)	Epididymis (mg)
K	1.32±0.18	29.39±3.11	216.65±47.01	101.65±23.65	194.76±34.78	72.41±12.15
T	1.26±0.13	31.44±2.77	224.53±23.59	112.53±22.74	208.93±40.90	76.73±9.02
KK	1.39±0.18	31.32±1.54	223.25±26.86	110.88±25.05	193.19±36.61	70.38±5.82
KT	1.29±0.18	30.22±3.58	218.27±29.72	113.47±30.59	204.27±42.04	73.93±8.21**
TK	1.32±0.08	30.71±1.81	221.33±17.94	106.00±42.78	216.44±17.68	72.56±7.37
TT	1.37±0.18	31.47±3.88	203.27±28.24*	127.13±24.28*	232.25±33.79**	72.13±7.32

Tabulka 4 – AGD, váha těla a orgánů. Mean±SD. N=20.

4.1.2 Parametry spermií

Abychom mohli posoudit vliv TBBPA na kvalitu spermií, hodnotili jsme jejich morfologii, viabilitu a stav akrosomu.

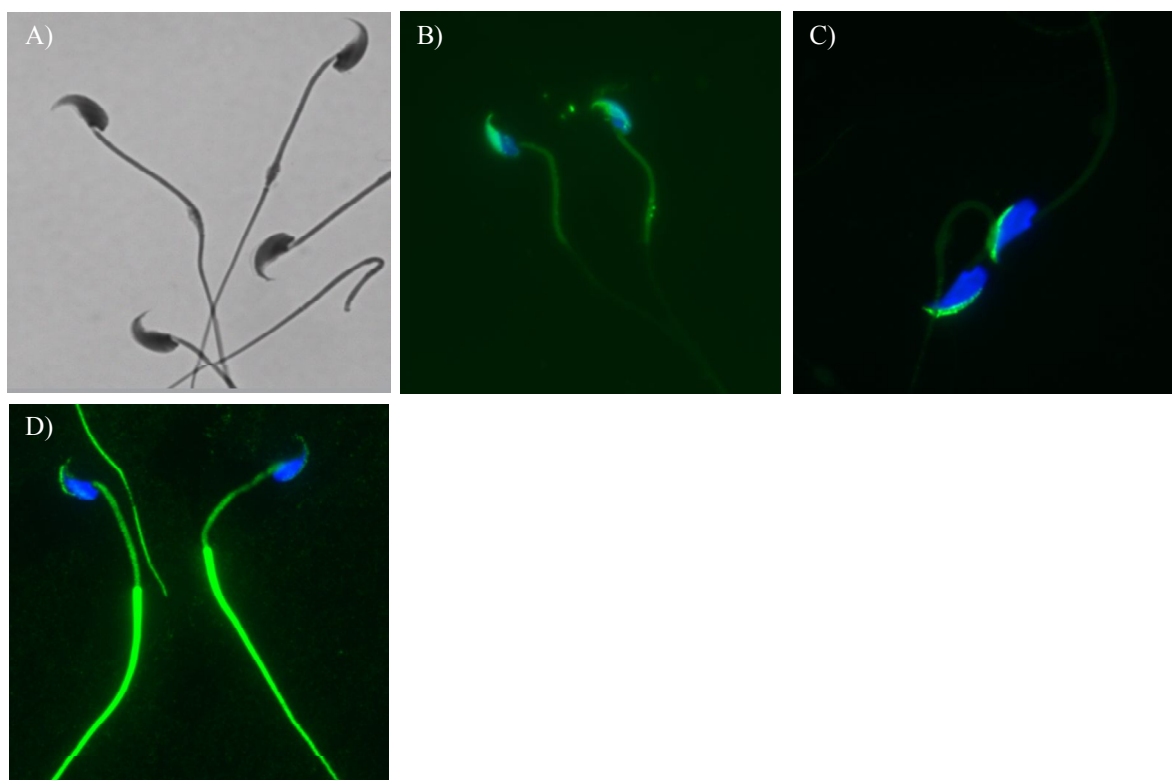
Ve všech skupinách bylo naměřeno kolem 90% morfologicky normálních spermií, rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly minimální. Podobný vzorec byl zaznamenán při hodnocení životnosti spermií (Tabulka 5; Obr.12A).

Apoptotický stav spermií byl hodnocen pomocí Annexinu V. Byl zaznamenán podobný počet Annexin pozitivních buněk ve všech skupinách. U jedinců skupiny TK z F2 generace jsme zaznamenali lehce zvýšený počet Annexin pozitivních buněk, ale tato hodnota nedosahovala signifikantní úrovně (Tabulka 5; Obr.12B).

Stav akrosomu byl testován pomocí monoklonálních protilátek HS-8 a HS-14. Barvení akrosomu bylo srovnatelné u jedinců všech skupin z obou generací (Tabulka 5; Obr.12C,D).

Skupina	Morfologie spermií (% normálních buněk)	Životnost spermií (% živých buněk)	Annexin V (% pozitivních buněk)	HS-14 (% akrozom pozitivních buněk)	HS-8 (% akrozom pozitivních buněk)
K	92.88±2.74	90.24±3.01	51.94±10.28	61.53±7.65	57.18±5.43
T	92.70±5.09	89.13±2.36	49.67±11.08	63.13±7.77	59.47±7.03
KK	89.87±2.24	89.68±1.77	51.06±9.01	61.87±2.41	57.18±1.68
KT	89.06±2.77	89.69±2.33	50.13±14.15	61.81±7.52	55.81±3.15
TK	88.44±3.13	89.89±1.17	59.89±10.56	64.56±2.40	55.00±3.04
TT	90.27±1.98	90.33±1.91	43.67±9.80	52.60±4.07	55.00±3.00

Tabulka 5 – Parametry spermií. Mean±SD. N=20.

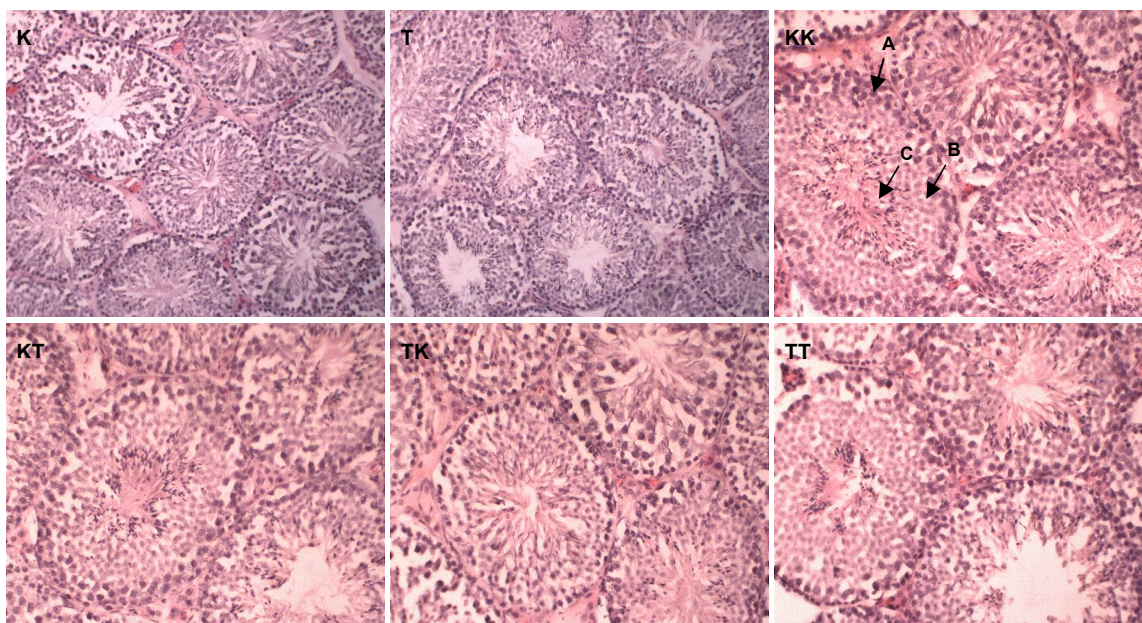


Obr. 12 – A) Zobrazení spermií pod fázovým kontrastem – hodnocení morfologie buněk; B) Značení Annexinem V; C) Značení monoklonální protilátkou Hs-14; D) Značení monoklonální protilátkou Hs-8

4.1.3 Histologie

Histologická analýza byla provedena na řezech testes. Vizuálně pod mikroskopem byla hodnocena morfologie semenotvorných kanálků a průběh spermatogeneze. U žádné skupiny nebyly zaznamenány viditelné anomálie či patologické změny v morfologii semenotvorných kanálků.

Rovněž průběh spermatogeneze nebyl přerušen. U všech skupin v obou generacích byly viditelné spermatogonie, spermatocyty a prodlužující se spermatocyty uvolňované do lumen (Obr.13)



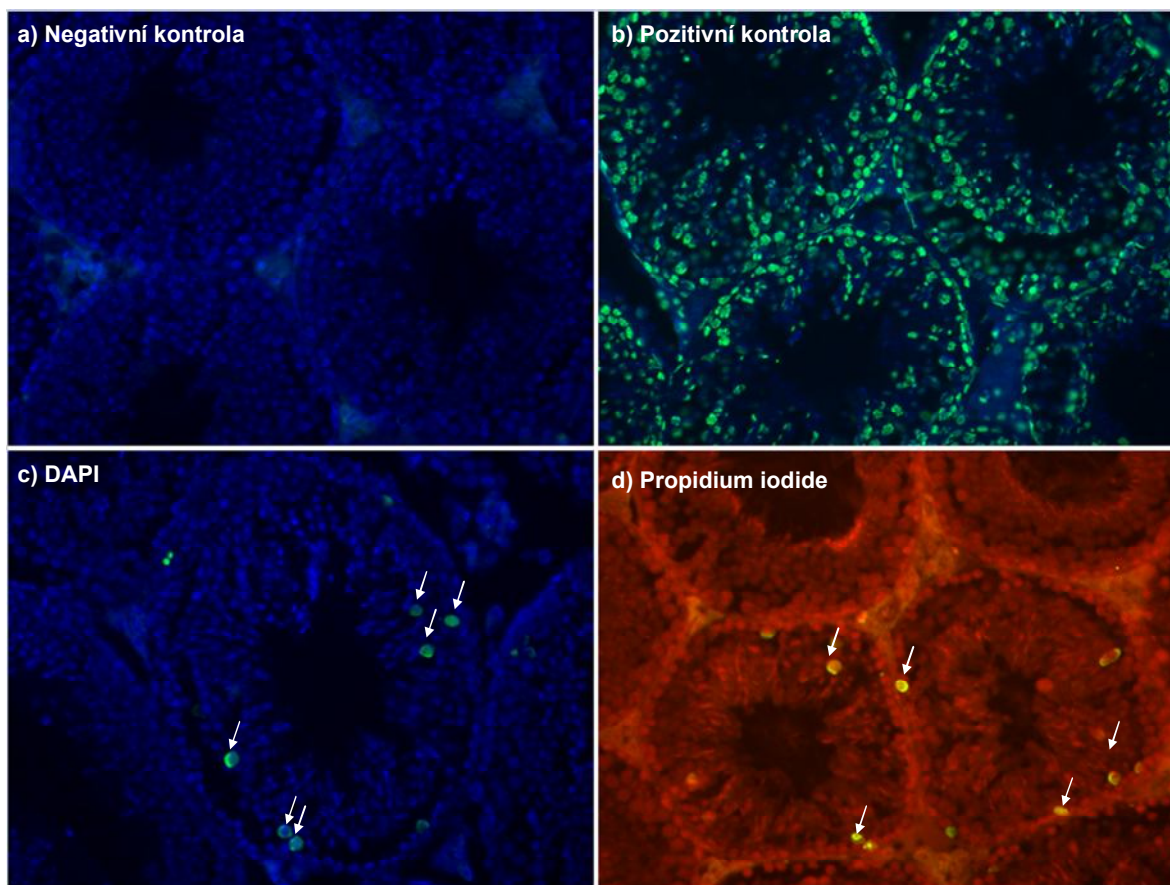
Obr. 13 – Histologické řezy testes obarvené Haematoxilinem a Eosinem (zvětšeno 600x). U skupiny KK jsou naznačené jednotlivé buněčné typy; A) spermatogonie; B) spermatocyty; C) prodlužující se spermatocyty uvolňované do lumen.

4.1.4 TUNEL analýza

TUNEL analýza byla provedena na řezech testes za účelem stanovení počtu apoptotických buněk. Největší nárůst počtu apoptotických buněk v testes byl nalezen u skupiny T z F1 generace, kde byl počet apoptotických buněk téměř dvojnásobný v porovnání s kontrolou. U skupin TT a TK z F2 generace byl rovněž zaznamenán signifikantně zvýšený počet apoptotických buněk v testes vůči kontrole a to přibližně 25%. Oproti tomu u skupiny KT z F2 generace nebyl zaznamenán rozdíl v počtu apoptotických buněk (Tabulka 6; Obr.14)

Skupina	TUNEL pozitivní buňky
K	25.65±1.62
T	42.27±6.10**
KK	24.67±1.37
KT	26.00±3.22
TK	31.00±2.10**
TT	30.50±2.81**

Tabulka 6 – TUNEL analýza. Mean±SD. N=20.



Obr. 14 – TUNEL analýza; a) Negativní kontrola – bez enzymu Terminální deoxynukleotidyl transferáza (TdT); b) Pozitivní kontrola – přidána DNasa I; c) Jádra barvená modře pomocí DAPI a šipky ukazují na apoptotické buňky; d) Jádra barvená červeně pomocí propidium iodide a šipky ukazují na apoptotické buňky.

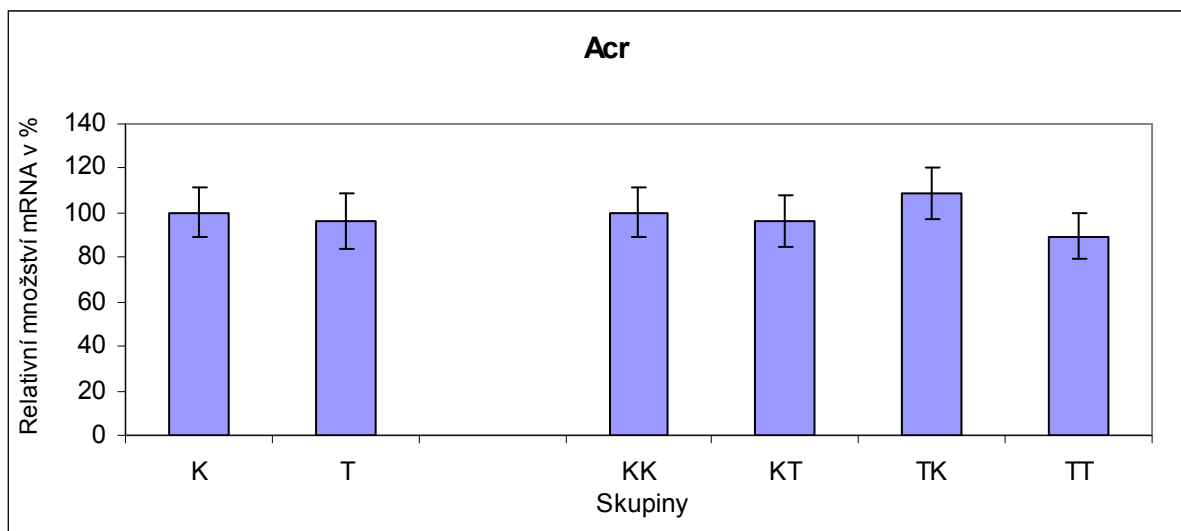
4.1.5 Genetická analýza (CD1 *in vivo* studie)

Genetická analýza byla provedena metodou Real Time PCR (RT-PCR) s primery pro geny určující proteiny akrosomu, androgen-rezponzivní geny, proteiny tepelného šoku (Hsps) a proteiny zodpovědné za regulaci apoptosy. Účelem bylo zjistit, zda-li je změněna jejich exprese v testech experimentálních zvířat.

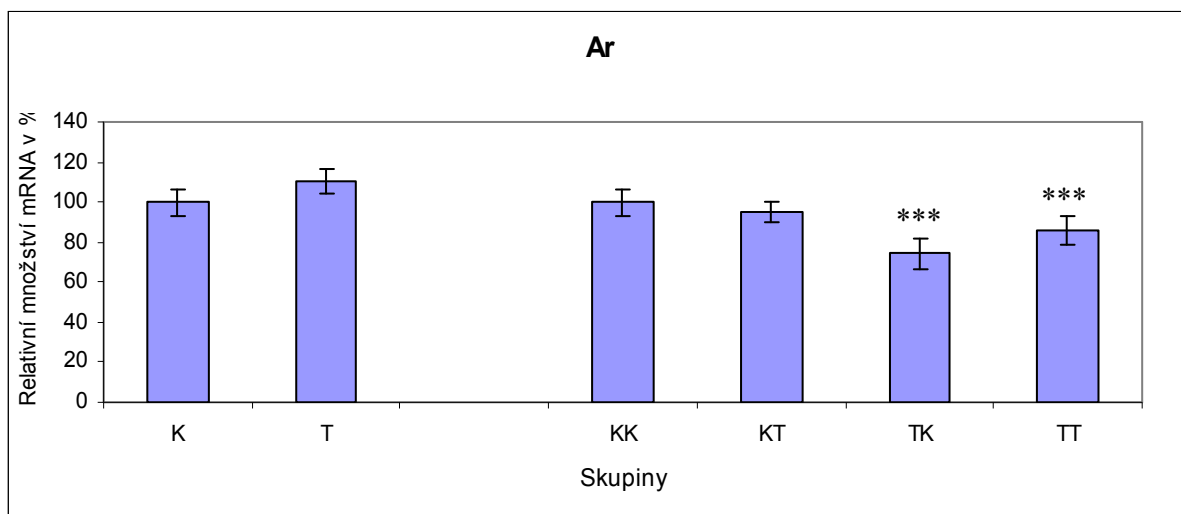
Jako akrosomální gen byl vybrán gen pro preacrosin (Acr) a jako zástupce androgen-responzivních genů byl vybrán gen pro androgenní receptor (Ar). Jako zástupci Hsps rodiny byly vybrány čtyři geny – Hsp70-2, HspA1L, Hsp60 a Apg-1 a jako zástupci proteinů hrajících roli v procesu apoptosy byly vybrány geny pro proteiny Bax a Bcl-2.

Expresí genu pro Acr byla srovnatelná u všech skupin v obou generacích. Expresí tohoto genu byla lehce snížena u skupiny TT z F2 generace ne však na

signifikantní úrovni (Obr.15). U samců z F1 generace nebyla zaznamenána signifikantní změna exprese genu pro androgenní receptor. Oproti tomu u skupin TK, TT z F2 generace byla zaznamenána signifikantně snížená ($P < 0,001$) exprese tohoto genu ve srovnání s kontrolou a to přibližně o 20% (Obr.16)



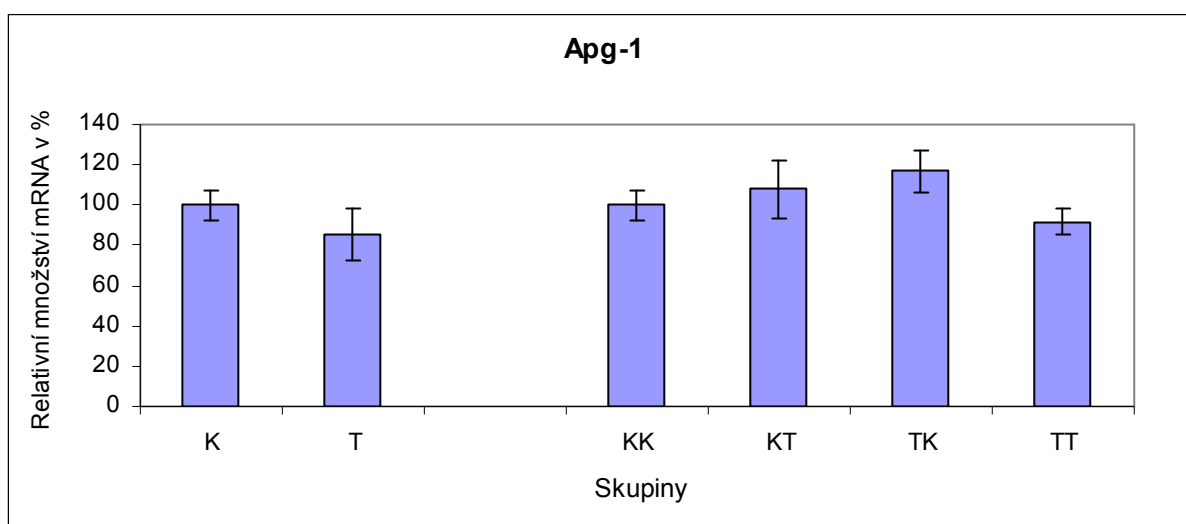
Obr. 15 – Relativní exprese genu pro protein preacrosin (Acr). N=20.



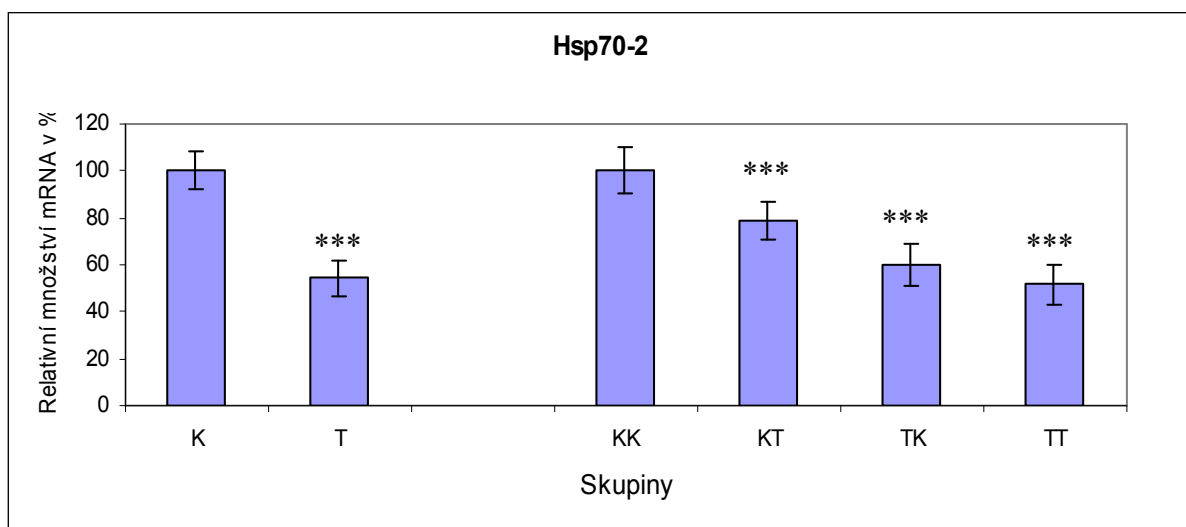
Obr. 16 – Relativní exprese genu pro protein androgení receptor (Ar). N=20.

Naše pokusy ukázaly poměrně značné změny v expresi vybraných Heat shock proteinů s výjimkou Heat shock proteinu Apg-1. Úroveň exprese genu pro Apg-1 dosahovala srovnatelných hodnot u všech skupin v obou generacích (Obr.17). Naproti tomu u genu pro protein Hsp70-2 byla zaznamenána signifikantně snížená exprese u všech experimentálních skupin v obou generacích ($P < 0,001$). Nejvíce snížená exprese byla pozorována u skupin T z F1 generace a TT z F2 generace,

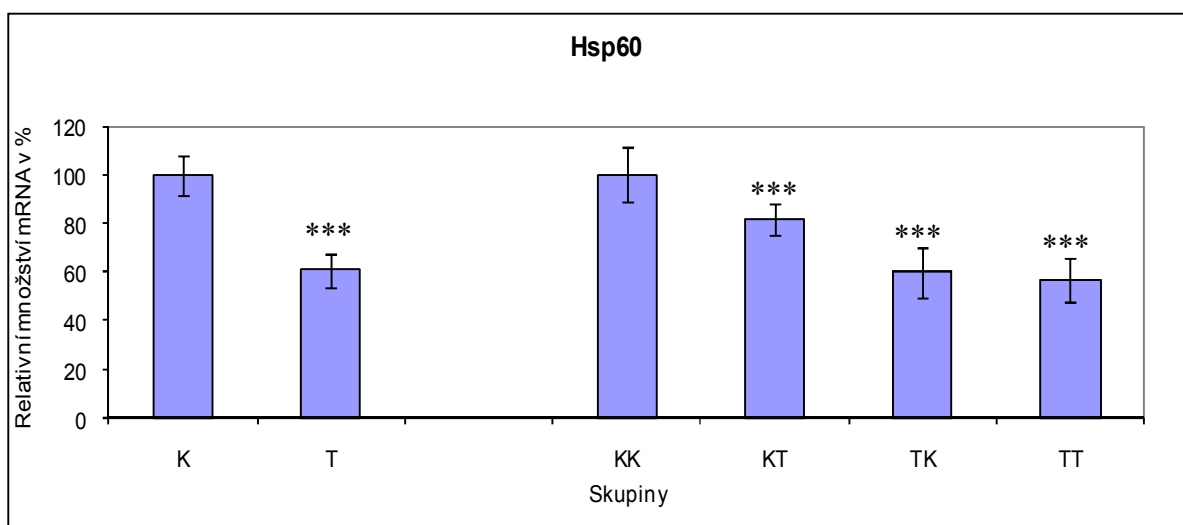
kde dosahovala polovičních hodnot ve srovnání s kontrolními skupinami (Obr.18). Podobná situace byla pozorována i u genu pro protein Hsp60, kde jsme opět sníženou expresi na signifikantní úrovni mohli pozorovat u všech experimentálních skupin jak v F1 tak v F2 generaci ($P < 0,001$). Snížená exprese byla nejvíce patrná u skupiny T z F1 generace a u skupin TK,TT z F2 generace, kde dosahovala téměř polovičních hodnot v porovnání s kontrolními skupinami (Obr.19). U genu pro protein Hsc70t byla pozorována naopak signifikantně zvýšená exprese a to u skupiny T z F1 generace a u skupin TK,TT z F2 generace ($P < 0,001$). Největší nárůst exprese byl pozorován u skupin T a TT, kde dosahoval téměř o 50% vyšších hodnot než tomu bylo u kontrolních skupin (Obr.20)



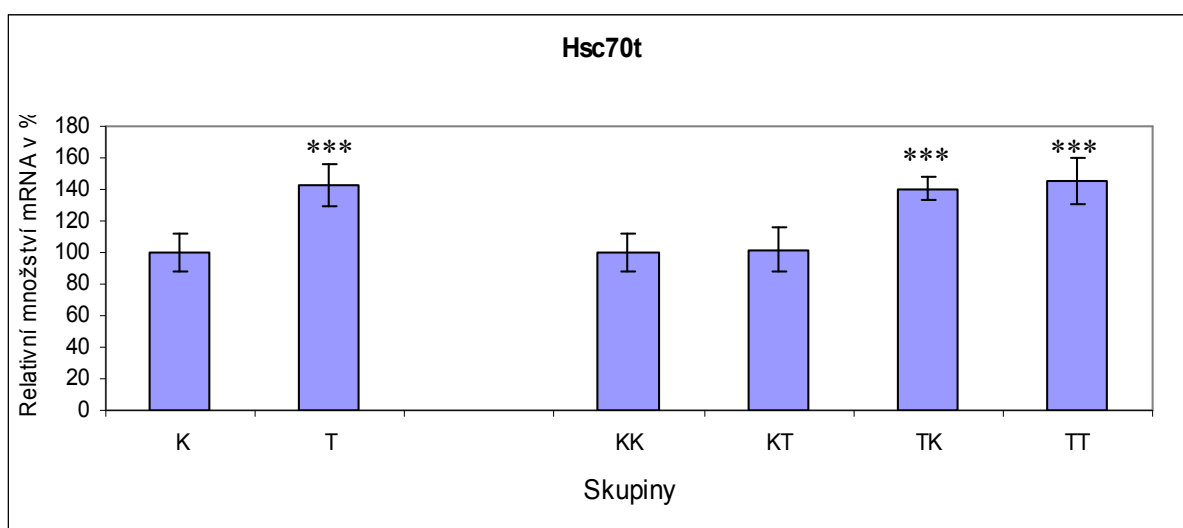
Obr. 17 – Relativní exprese genu pro protein Apg-1. N=20.



Obr. 18 – Relativní exprese genu pro protein Hsp70-2. N=20.



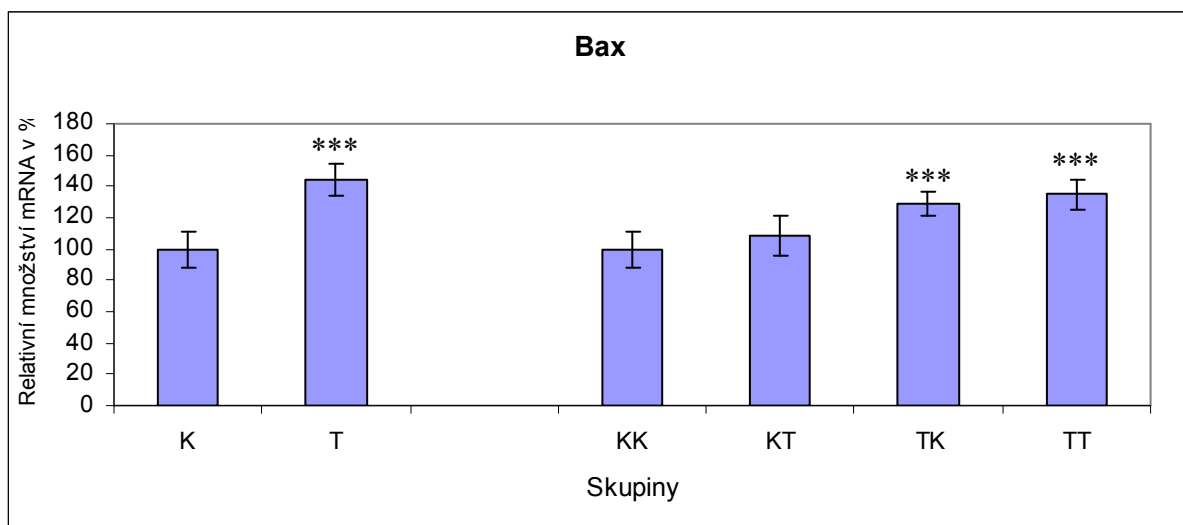
Obr. 19 – Relativní exprese genu pro protein Hsp60. N=20.



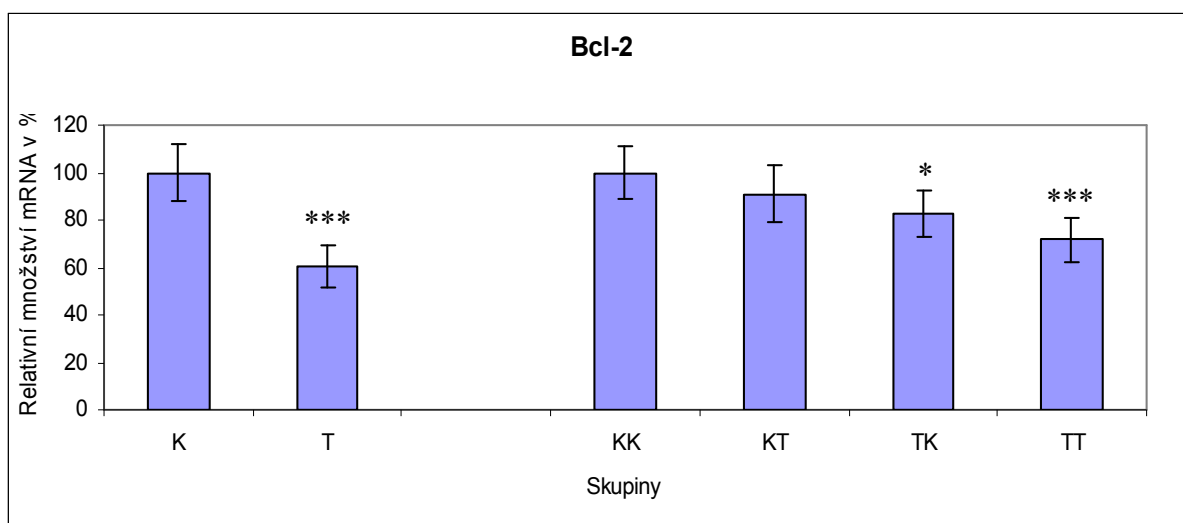
Obr. 20 – Relativní exprese genu pro protein Hsc70t. N=20.

Změna v expresi byla pozorována také u genů kódujících apoptotické proteiny Bax a Bcl-2. U genu pro proapoptotický protein Bax byla pozorována signifikantně zvýšená exprese a to u skupiny T z F1 generace a u skupin TK, TT z F2 generace ($P < 0,001$). Největší navýšení exprese genu Bax byla zaznamenána u skupin T z F1 generace a TT z F2 generace. U těchto skupin byla naměřena o 40% respektive 30% vyšší exprese v porovnání s kontrolními skupinami (Obr.21). Naopak snížená hladina exprese byla pozorována v případě genu pro antiapoptotický protein Bcl-2. Signifikantně snížená exprese byla zjištěna u skupiny T z F1 generace ($P < 0,001$) a u skupin TK ($P < 0,05$) a TT ($P < 0,001$) z F2 generace. Největší pokles v genové

expresi byl zaznamenán u skupiny T z F1 generace, kde míra exprese byla o 40% nižší v porovnání s kontrolní skupinou (Obr.22)



Obr. 21 – Relativní exprese genu pro protein Bax. N=20.



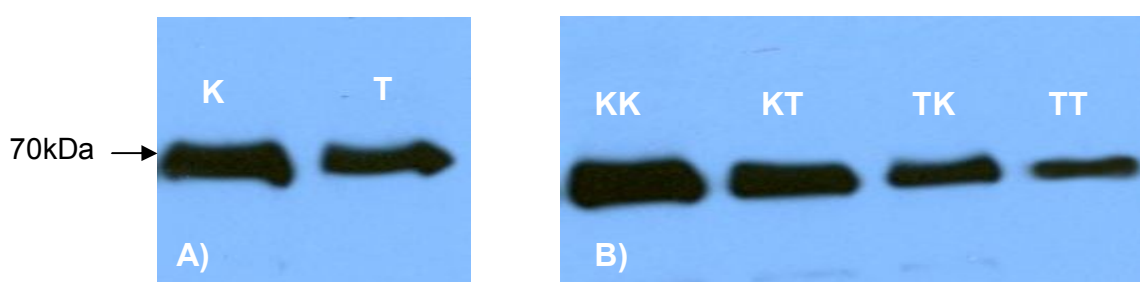
Obr. 22 – Relativní exprese genu pro protein Bcl-2. N=20.

4.1.6 Imunodetekce vybraných Heat shock proteinů

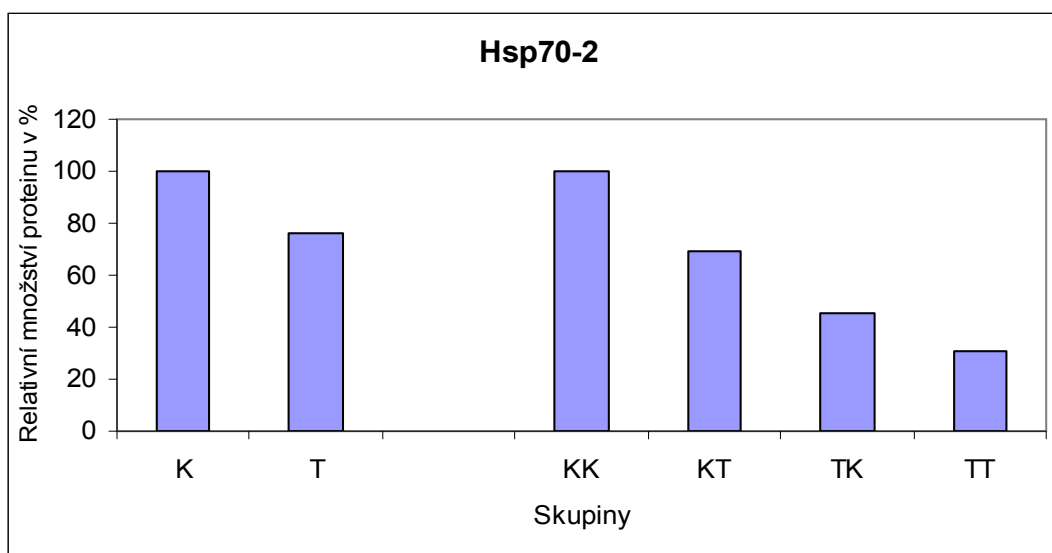
Za použití metody Western blot byla provedena imunodetekce vybraných Heat shock proteinů (Hsps) v testikulární tkáni. Vybrány byly Hsps, u kterých byla zjištěna změna v jejich expresi u experimentálních skupin, ovlivněných látkou TBBPA, to znamená – Hsp70-2, Hsp60 a HspA1L (viz výše).

Na imunoblotu za použití monoklonální protilátky proti Hsp70-2 byly patrné rozdíly v množství detekovaného proteinu (Obr.23). Ke kvantifikaci detekovaných

rozdílů byl použit program AIDA. Nejprve byla provedena kalibrace kontrolních skupin (skupina K – F1 generace a skupina KK – F2 generace), ke kterým byly vztahovány skupiny experimentální. Kalibrace byla provedena tak, že množství proteinu v kontrolních skupinách představovalo 100%. Mezi kontrolními a experimentálními skupinami byly zjištěny následující kvantitativní rozdíly. Ve vzorku T (F1 generace) bylo detekováno o 25% méně proteinu v porovnání se vzorkem K (F1 generace). Dále u vzorků získaných od zvířat z F2 generace, kde skupina KK odpovídala 100% proteinu, bylo naměřeno 70% proteinu u skupiny KT, 45% proteinu u skupiny TK a 32% proteinu u skupiny TT (Obr.24).



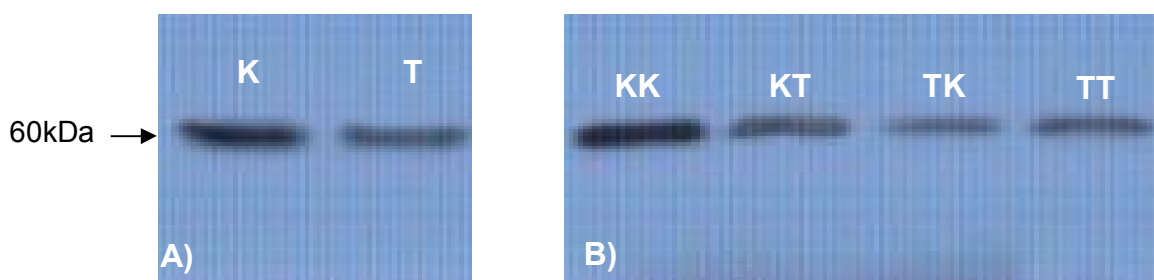
Obr. 23 – Imunodetekce proteinu Hsp70-2; A) F1 generace; B) F2 generace



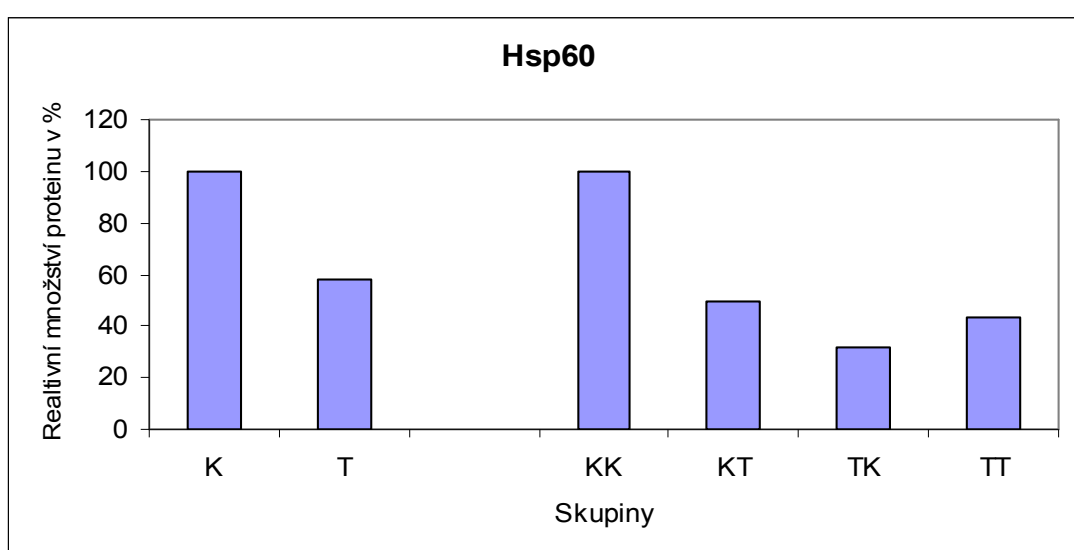
Obr. 24 – Kvantifikace detekovaných proteinů za použití protilátky proti proteinu Hsp70-2.

Na imunoblotu za použití monoklonální protilátky proti proteinu Hsp60 byly rovněž patrné rozdíly v množství detekovaného proteinu (Obr.25). Tyto rozdíly byly opět kvantifikovány programem AIDA a to stejným způsobem jako tomu bylo u vzorků předešlých. Po kvantifikaci programem AIDA jsme získali následující

výsledky. V F1 generaci skupina K odpovídala 100% proteinu a skupina T 60% proteinu. V případě F2 generace skupina KK odpovídala 100% proteinu, skupina KT 50% proteinu, skupina TK 32% proteinu a skupina TT 44% proteinu (Obr.26).

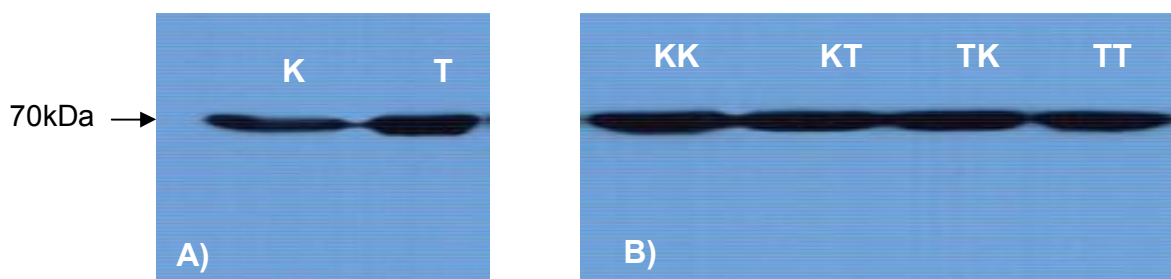


Obr. 25 – Imunodetekce proteinu Hsp60; A) F1 generace; B) F2 generace

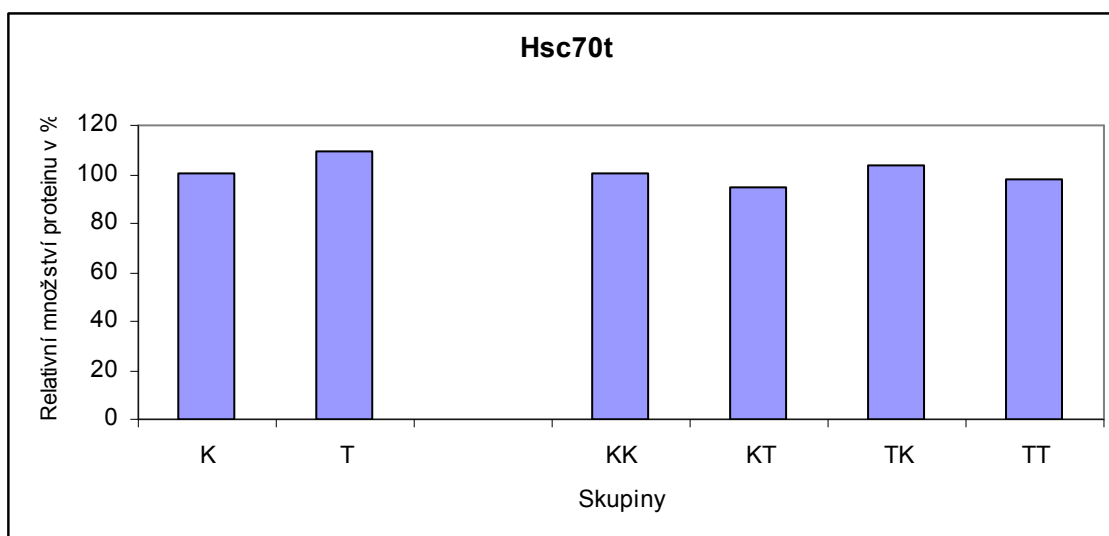


Obr. 26 – Kvantifikace detekovaných proteinů za použití protilátky proti proteinu Hsp60.

Na imunoblotu za použití monoklonální protilátky proti proteinu HspA1L nebyly patrné žádné výrazné změny v detekci (Obr 27), což bylo potvrzeno i programem AIDA, který rovněž nezaznamenal žádné výrazné kvantitativní rozdíly (Obr.28).

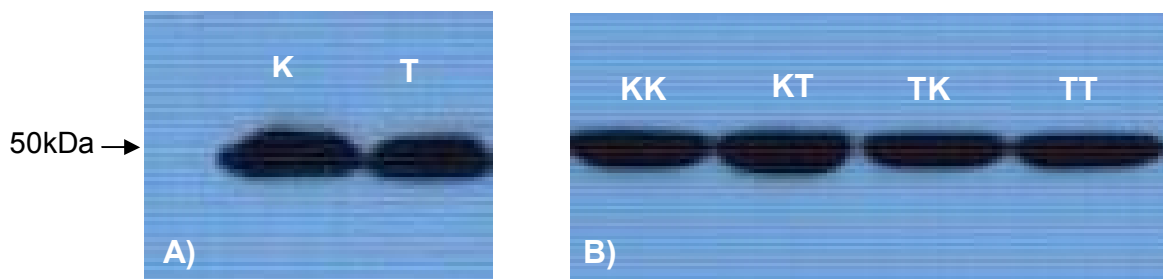


Obr. 27 – Imunodetekce proteinu Hsc70t; A) F1 generace; B) F2 generace



Obr. 28 – Kvantifikace detekovaných proteinů za použití protilátky proti proteinu Hsc70t.

Pro kontrolu byla použita detekce pomocí protilátky proti α -tubulinu, jehož exprese je v buňkách neměnná. Tato kontrola slouží jako pozitivní kontrola reakce a také jako nanášková kontrola, která ukazuje zda-li bylo nanášeno stejné množství proteinu u všech vzorků. Obr. 29 ukazuje, že všude bylo nanášeno téměř shodné množství proteinu, což potvrdila i kvantifikace pomocí programu AIDA (data neukázána).



Obr. 29 – Imunodetekce proteinu α -tubulinu; A) F1 generace; B) F2 generace

4.2 Výsledky studie provedené na C57BL/6 myších *in vivo*

Tato část je věnována výsledkům získaných z jednogenerační studie provedené na inbrední myší linii C57BL/6 (BL/6).

4.2.1 Váha těla a orgánů

Abychom posoudili vliv látky TBBPA hodnotili jsme různé reprodukční parametry. Mezi prvními byla porovnávána anogenitální vzdálenost (AGD) a váha těla a jednotlivých reprodukčních orgánů u jedinců ovlivněných látkou TBBPA vůči kontrolní skupině. Hodnocenými reprodukčními orgány byly – testes, prostata, semenné vaky a epididymis.

Hodnoty AGD a váha těla byly srovnatelné v obou skupinách s minimálními rozdíly. Podobně tomu bylo i u reprodukčních orgánů, kdy hmotnost testes a epididymu byla téměř shodná u obou skupin. Hmotnost prostaty byla zvýšená u skupiny ovlivněné TBBPA, avšak hodnoty nedosahovaly signifikantní úrovně a to především kvůli značnému rozptylu v naměřených hodnotách. V případě semenných vaků byla rovněž zaznamenána zvýšená hmotnost u skupiny ovlivněné látkou TBBPA a to na signifikantní úrovni ($P < 0,05$). Všechny naměřené hodnoty jsou shrnuty v Tabulce 7.

Skupina	AGD (cm)	Váha těla (g)	Testes (mg)	Prostata (mg)	Semenné vaky (mg)	Epididymis (mg)
Kontrola	1.3±0.14	23.14±1.97	85.7±12.3	67.4±22.2	134.8±29.9	31.8±9.9
TBBA	1.4±0.08	23.78±1.92	87.7±8.3	84.4±20.6	154.1±20.1*	27.4±3.4

Tabulka 7 – AGD, váha těla a orgánů. Mean±SD. N=20.

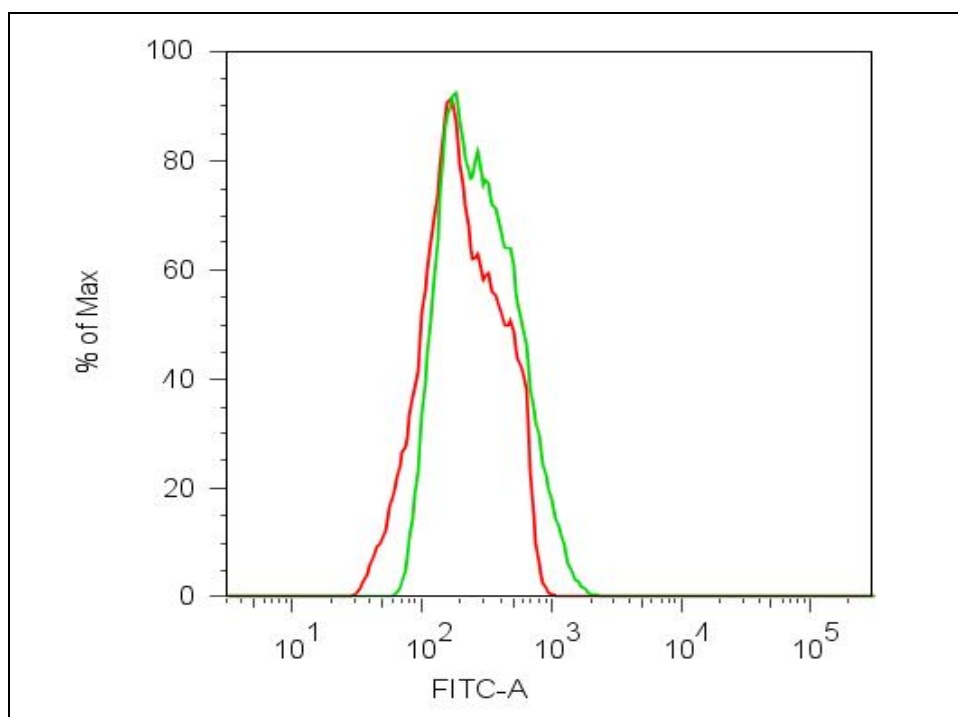
4.2.2 Určení množství apoptotických buněk v testikulární buněčné suspenzi na průtokovém cytometru (TUNEL analýza)

Na průtokovém cytometru byla stanovena míra intenzity apoptosy v buněčné suspenzi získané z pravého testes experimentálních a kontrolních myší. Tato metoda umožňuje nejen stanovení celkového počtu apoptotických buněk v suspenzi, ale je také schopná určit množství apoptotických buněk nacházející se v jednotlivých buněčných stádiích – tetraploidní, diploidní a haploidní stadium.

Data získaná z měření na průtokovém cytometru ukázala signifikantně zvýšený ($P<0,05$) počet TUNEL pozitivních buněk v buněčné suspenzi z testes jedinců ovlivněných TBBPA. Počet TUNEL pozitivních buněk v populaci haploidních a tetraploidních buněk u kontrolní a TBBPA skupiny se příliš nelišil, zatímco počet TUNEL pozitivních buněk u diploidní buněčné populaci byl signifikantně navýšen ($P<0,01$) v případě skupiny ovlivněné látkou TBBPA a to zhruba o 15% (Tabulka 8). Průběh reakce je znázorněn na Obr.30.

Skupina	Celková intenzita signálu v kanálu FITC	Celková intenzita signálu v kanálu FITC u haploidních buněk	Celková intenzita signálu v kanálu FITC u diploidních buněk	Celková intenzita signálu v kanálu FITC u tetraploidních buněk
Kontrola	474±32.2	322±27.5	450±29.3	650±39.7
TBBPA	515±39.3*	345±31.8	520±34.7**	681±35.2

Tabulka 8 – TUNEL analýza na průtokovém cytometru. Mean±SD. N=20.

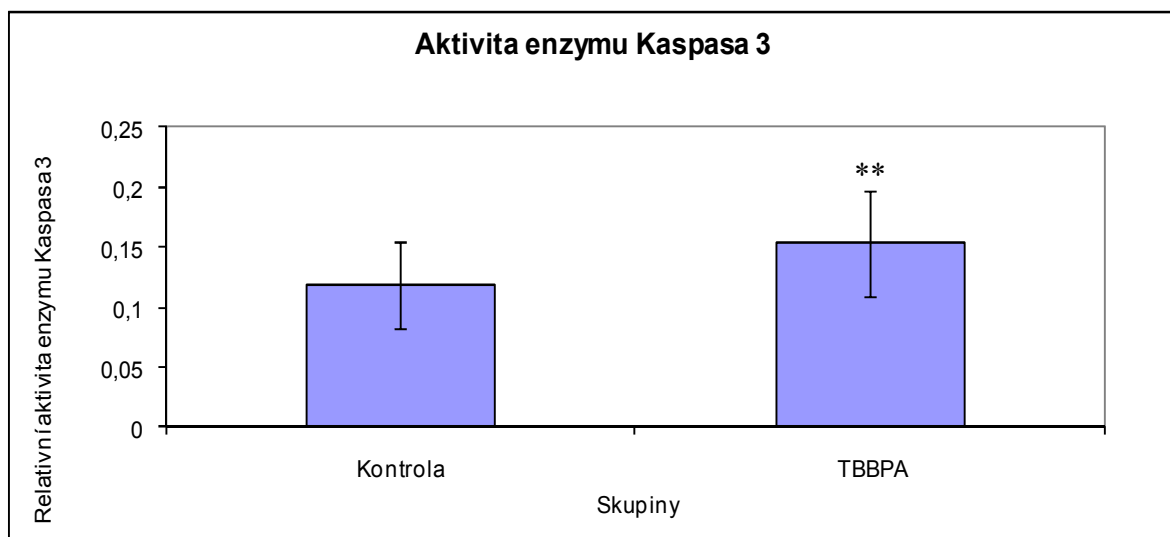


Obr. 30 – Histogram znázorňuje intenzitu signálu testikulárních buněk v kanálu FITC pro kontrolní skupinu (červená křivka) a pro skupinu TBBPA (zelená křivka).

4.2.3 Aktivita enzymu kaspasa 3

V dalším kroku jsme sledovali aktivitu enzymu kaspasa 3 v testikulární tkáni získané z levého testes BL/6 myší. Výsledky této analýzy jsou ukázány na Obr.31.

U myší ovlivněných látkou TBBPA byla signifikantně navýšena aktivita tohoto enzymu ($P < 0,01$) a to o 25% v porovnání s kontrolní skupinou.



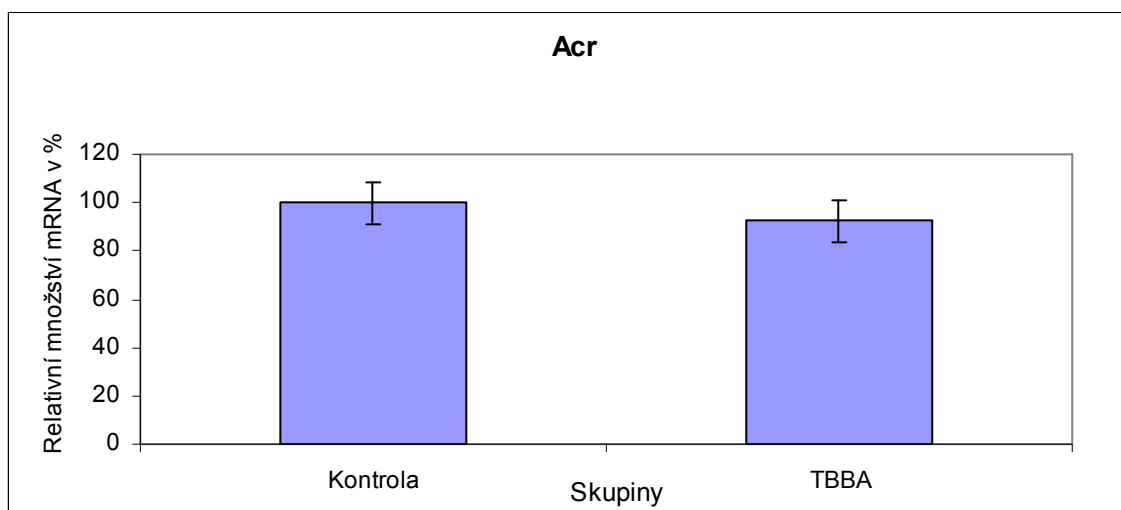
Obr. 31 – Relativní aktivita enzymu kaspasa 3. N=20.

4.2.4 Genetická analýza (BL/6 *in vivo* studie)

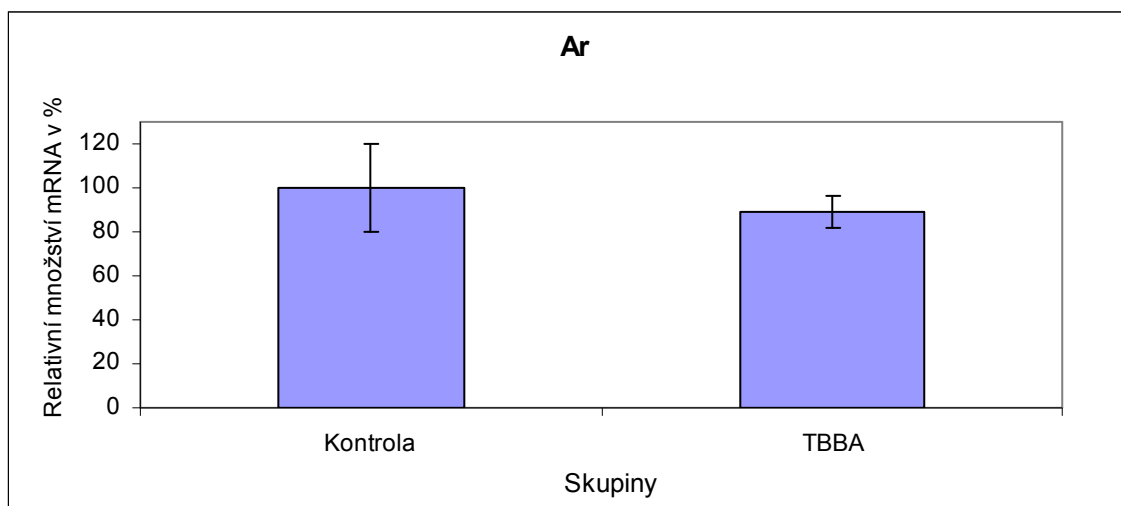
Genetická analýza byla provedena s použitím metody zvané Real Time PCR (RT-PCR) s primery pro geny určující proteiny akrosomu, androgeny, proteiny tepelného šoku (Hsps) a apoptosu.

Gen pro protein preacrosin (Acr) byl vybrán jako zástupce akrosomálních proteinů, dále byl vybrán gen pro androgenní receptor (Ar), jako zástupce androgen-responzivních genů. Z rodiny Hsps byly vybráni čtyři zástupci a to – Hsp70-2, HspA1L, Hsp60 a Apg-1. Dalšími testovanými geny, byly geny, které hrají roli v procesu apoptosy, a to geny pro antiapoptotický protein Bcl-2 a proapoptotický protein Bax.

Míra exprese genu pro Acr u jedinců ovlivněných látkou TBBPA byla téměř shodná s mírou exprese jedinců z kontrolní skupiny (obr.32). Podobně tomu bylo u exprese genu pro androgenní receptor, kde rovněž nebyly zaznamenány změny v expresi experimentální skupině v porovnání se skupinou kontrolní (Obr.33)

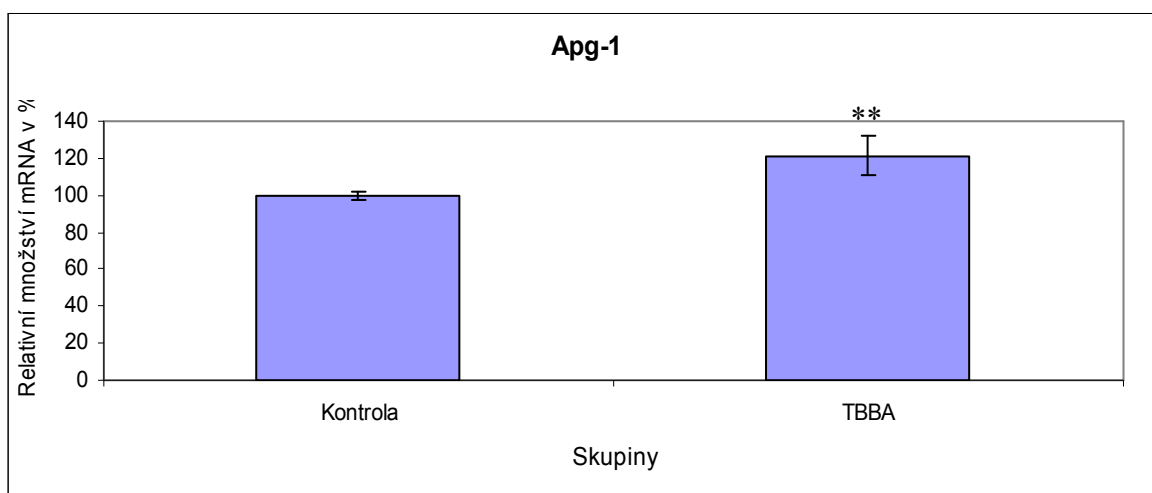


Obr. 32 – Relativní exprese genu pro protein presacrosin (Acr). N=20.

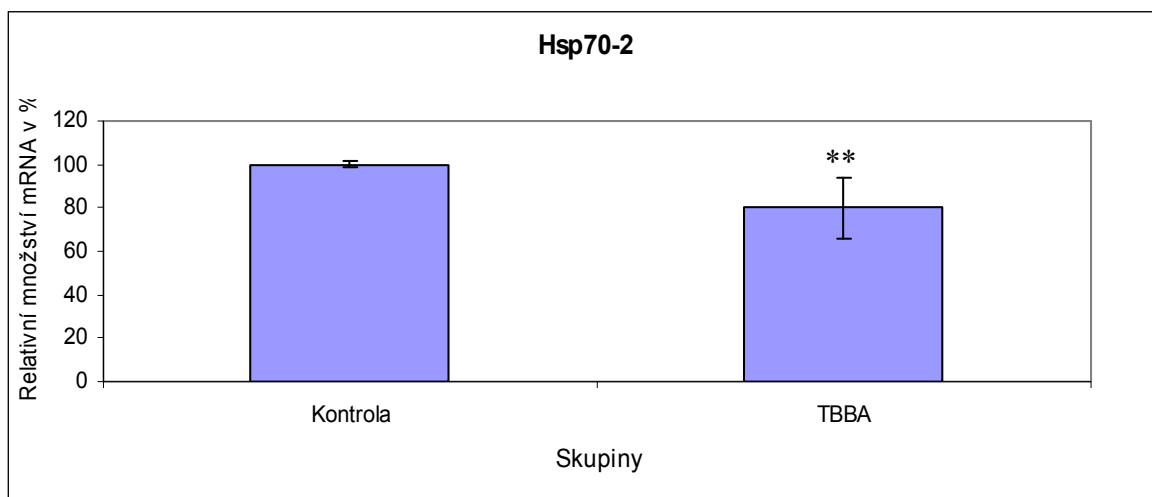


Obr. 33 – Relativní exprese genu pro protein androgení receptor (Ar). N=20.

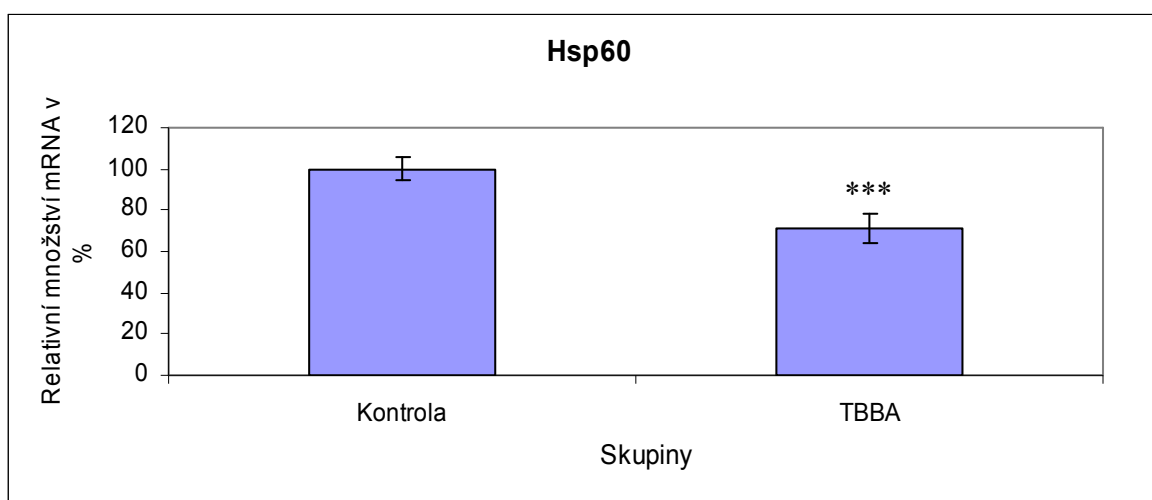
Opět byla zaznamenána změna v expresi genů pro vybrané Heat shock proteiny (Hsp). U genu pro Heat shock protein Apg-1 byla naměřena signifikantně zvýšená ($P < 0,01$) exprese u jedinců ze skupiny TBBPA oproti kontrolní skupině přibližně o 20 % (Obr.34). Dalším hodnoceným genem byl gen pro Hsp70-2. Exprese tohoto genu byla signifikantně snížena ($P < 0,01$) u jedinců z experimentální skupiny v porovnání s kontrolní skupinou a to o přibližně 20% (Obr.35). U genu pro Hsp60 byla také zaznamenána signifikantně snižená exprese ($P < 0,001$) u skupiny TBBPA. Exprese daného genu byla snížena téměř o 30% ve srovnání s kontrolní skupinou (Obr.36). Naopak exprese genu pro Hsc70t se u experimentálních zvířat nelišila proti kontrole (Obr.37).



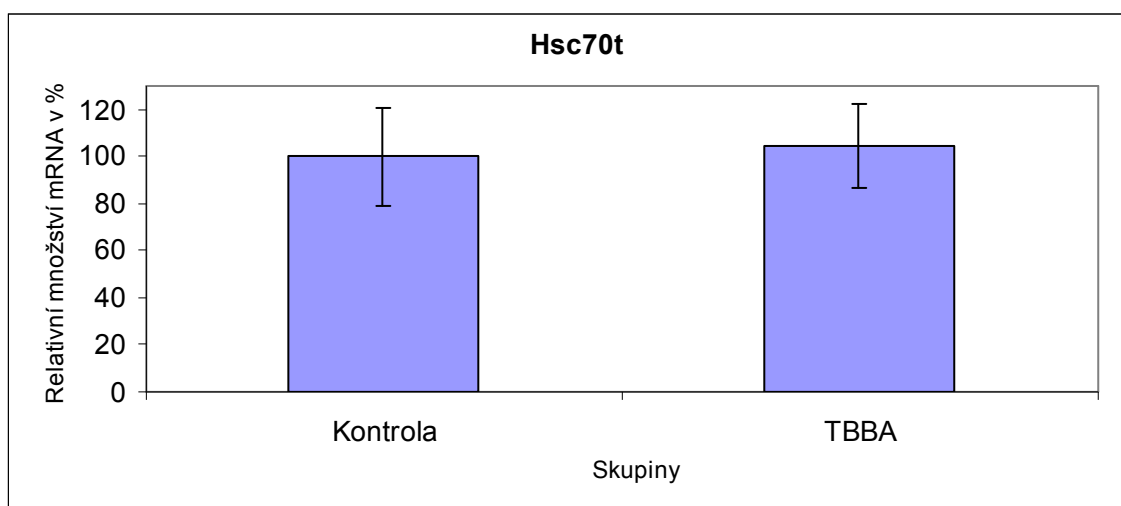
Obr. 34 – Relativní exprese genu pro protein Apg-1. N=20.



Obr. 35 – Relativní exprese genu pro protein Hsp70-2. N=20.

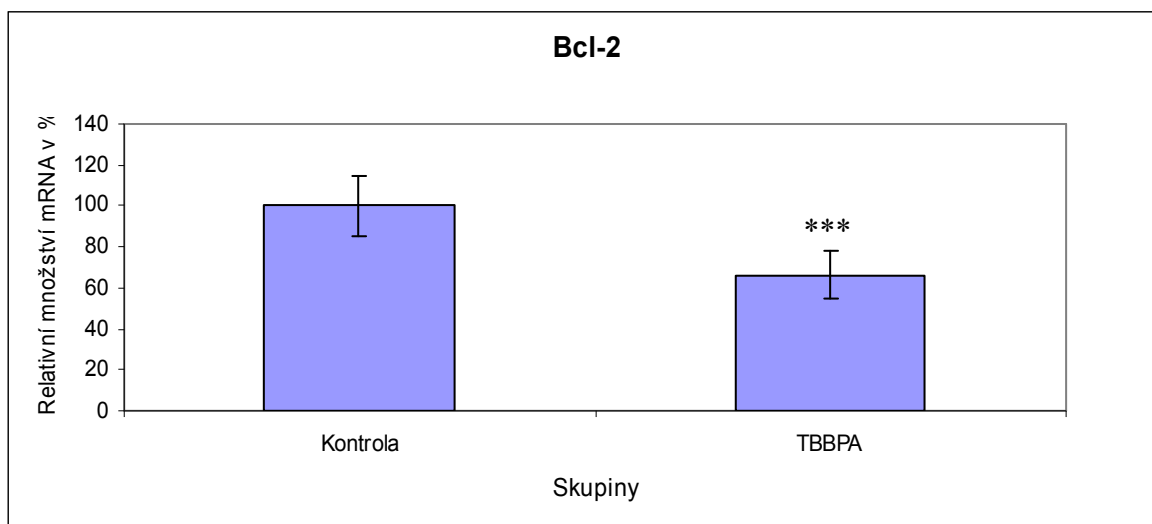


Obr. 36 – Relativní exprese genu pro protein Hsp60. N=20.

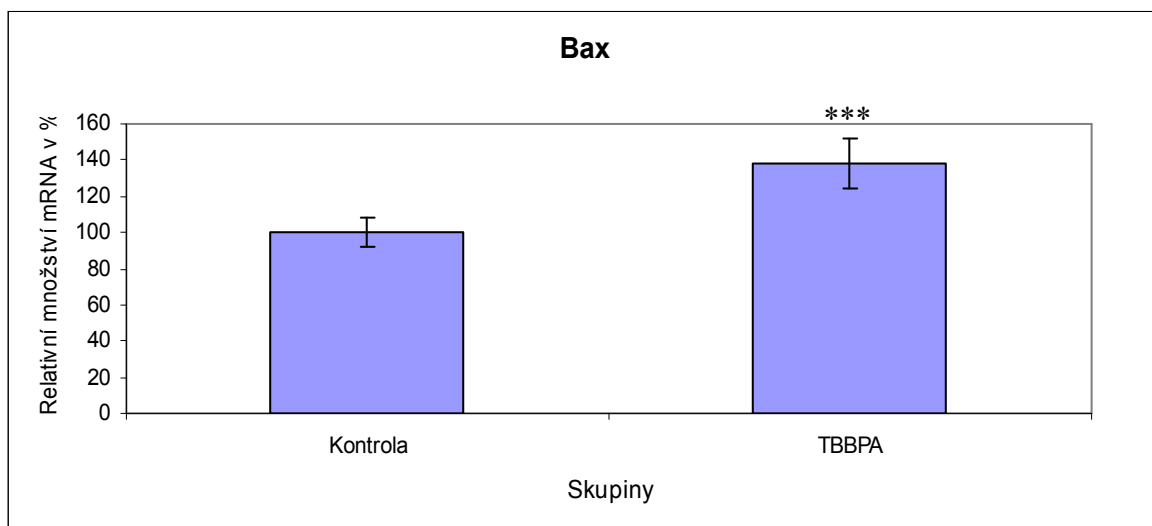


Obr. 37 - Relativní exprese genu pro protein Hsc70t.

Změna exprese byla zaznamenána i u genů kódujících apoptotické proteiny Bax a Bcl-2. Exprese genu pro antiapoptotický protein Bcl-2 byla snížena u skupiny TBBPA na signifikantní úrovni ($P < 0,001$) téměř o 40% vůči kontrole (Obr. 38). Naproti tomu exprese genu pro proapoptotický protein Bax byla u této skupiny zvýšena téměř o 40% ($P < 0,001$) (Obr. 39). $N=20$.



Obr. 38 – Relativní exprese genu pro protein Bcl-2. $N=20$.

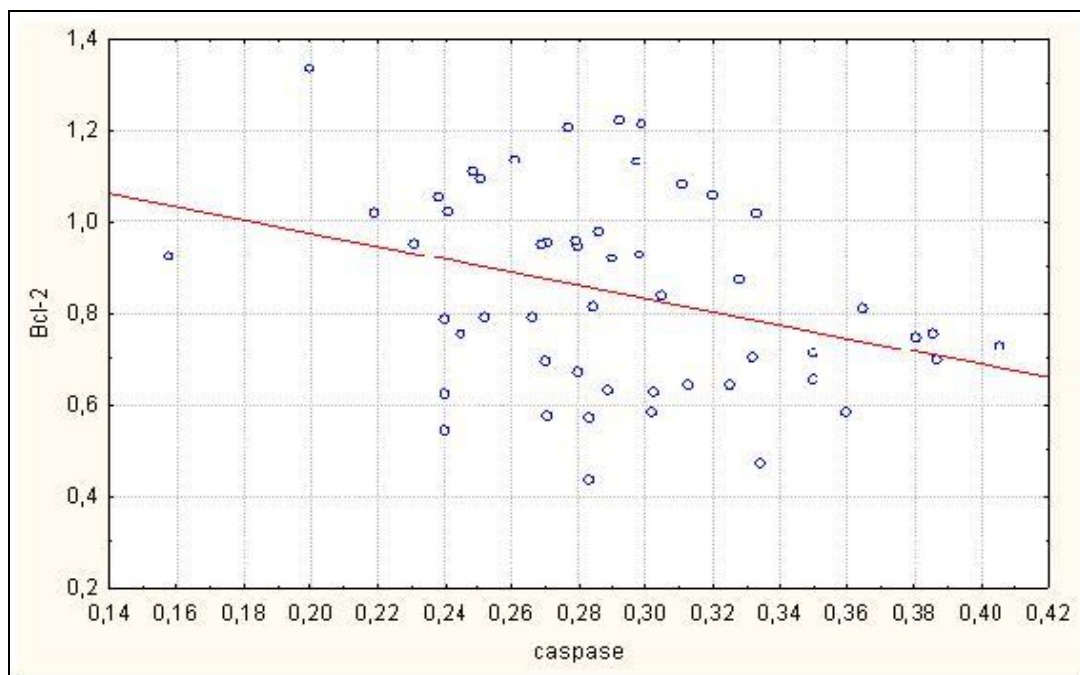


Obr. 39 – Relativní exprese genu pro protein Bax. N=20.

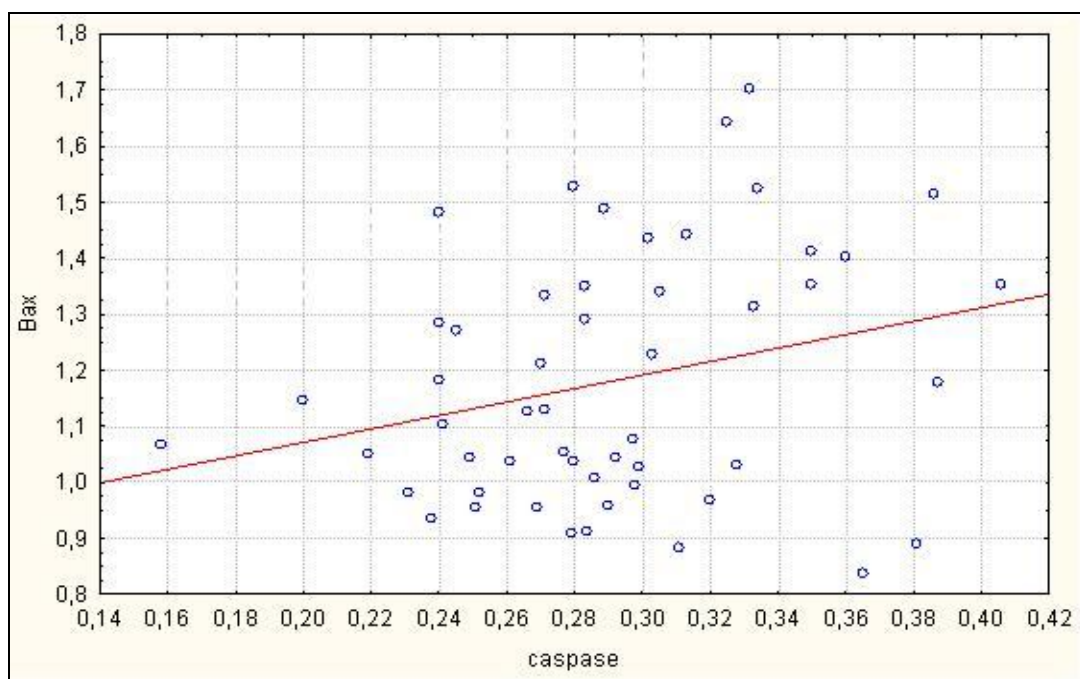
4.2.5 Korelace dat získaných z Caspase 3 assay a Real Time PCR provedeného s primery pro geny Bax a Bcl-2

Byla korelována data získaná z Caspase 3 assay, která určuje aktivitu enzymu kaspasa 3, s daty získanými pomocí Real Time PCR (RT PCR) s primery pro geny Bax a Bcl-2. Kaspasa 3 je enzym, který slouží jako hlavní vykonavatel apoptotického procesu a proteiny Bax a Bcl-2 také hrají klíčovou roli v tomto procesu (Bcl-2 antiapoptotický protein; Bax – proapoptotický protein).

Byla zjištěna negativní korelace (pearsonův koeficient -0,33) mezi daty získanými pomocí Caspase 3 assay a RT PCR s primery pro gen Bcl-2 (Obr.40). Dále byla zjištěna pozitivní korelace (pearsonův koeficient 0,271) mezi daty získanými z caspase 3 assay a RT PCR s primery pro gen Bax (Obr.41).



Obr. 40 – Korelace dat získaných z caspase 3 assay a RT PCR s primery pro gen Bcl-2.



Obr. 41– Korelace dat získaných z Caspase 3 assay a RT PCR s primery pro gen Bax.

5 Diskuze

V našem životním prostředí se vyskytuje celá řada syntetických látek, které jsou produkovány lidskou činností. U mnoha z těchto látek byl již prokázán negativní vliv na zdraví a reprodukci lidí. Předpokládá se výskyt takovýchto látek v prostředí je jednou z příčin zhoršujícího se mužského reprodukčního zdraví v posledních letech (WHO, 2009).

Jedna z látek, která v posledních letech vzbudila pozornost je tetrabrombisfenol A (TBBPA). TBBPA je hojně využíván jako látka zpomalující hoření. Díky jeho vysoké spotřebě a faktu, že byl nalezen v životním prostředí (Watanabe et al., 1983; Sellstrom and Jansson, 1995; Sjödin et al., 2003) a dokonce v lidském těle (Legler, 2008), byl TBBPA zařazen na seznam potenciálně škodlivých látek.

V naší studii byl efekt TBBPA nejprve otestován v dvougenerační *in vivo* studii na outbredních CD1 myších s vysokou heterozygotitou, která napodobuje situaci v lidské populaci. TBBPA byl myším podáván perorálně rozpuštěný ve vodě v koncentraci 200 µg/l. V této studii byl testován vliv TBBPA na reprodukční parametry myší (váha těla a reprodukčních orgánů, anogenitální vzdálenost, kvalita spermií, histopatologie testes), dále byla zjišťována míra apoptosy v testikulární tkáni a exprese genů kódujících vybrané proteiny (akrosomální, androgen responzivní, heat shock a apoptotické proteiny).

U myší ovlivněných látkou TBBPA nebyly pozorovány změny v počtu potomků ani poměr samců a samic ve vrhu ovlivněn nebyl. U skupiny TT z F2 generace byla zaznamenána změněná váha reprodukčních orgánů a to váha testes, která byla signifikantně snížena oproti kontrolní skupině a váha prostaty a semenných vaků, která byla naopak signifikantně snížena ve srovnání s kontrolní skupinou. Ostatní měřené parametry (AGD, váha těla a váha epididymu) změněny nebyly. U skupiny KT byla zaznamenána zvýšená váha epididymu ve srovnání s kontrolní skupinou (Tabulka 4). Vzhledem k tomu, že ostatní parametry u této skupiny ovlivněny nebyly, nepřikládali jsme tomuto zjištění velkou důležitost. U ostatních skupin nebyla zaznamenána žádná změna ve váze těla, reprodukčních orgánů a AGD ve srovnání s kontrolními skupinami. Z uvedeného lze tedy usuzovat, že TBBPA mělo největší vliv v případě skupiny TT z F2 generace, ikdyž nebyl ovlivněn počet potomků, zdá se, že tato látka ovlivnila vývoj reprodukčních orgánů u této skupiny.

Dalším hodnoceným parametrem byla kvalita spermií. Data získaná z hodnocení koncentrace spermií vykazovala významné rozptyly v naměřených hodnotách a nebylo proto možné z těchto dat usoudit zda-li byla koncentrace spermií ovlivněna u experimentálních zvířat či nikoliv. Nicméně ostatní měřené parametry spermií ovlivněny nebyly. U epididymálních spermií získaných z experimentálních zvířat myši nebyly zaznamenány žádné morfologické abnormality ani snížená životnost či zvýšený počet apoptotických buněk ve srovnání s kontrolou Stav akrosomu, který byl hodnocen pomocí monokonálních protilátek proti intra-akrosomálním proteinům, také nebyl ovlivněn (Tabulka 5). Zdá se tedy, že látka TBBPA neměla vliv na kvalitu spermií u experimentálních zvířat, nelze však posoudit její vliv na koncentraci spermií.

Histologická studie neprokázala žádné viditelné anomálie či patologické změny v morfologii semenotvorných kanálků (Obr.13). Avšak TUNEL analýza na histologických řezech testes prokázala signifikantně zvýšený počet apoptotických buněk v testes experimentálních zvířat a to u skupin T z F1 generace a skupin TT a TK z F2 generace (Tabulka 6). U těchto skupin byla rovněž zaznamenána signifikantně zvýšená exprese genu pro proapoptotický protein Bax a snížená exprese genu pro antiapoptotický protein Bcl-2 (Obr.21,22).

Proteiny Bax a Bcl-2 hrají klíčovou roli v aktivaci apoptotického procesu v buňkách. Antiapoptotický protein Bcl-2 umístěný na vnější mitochondriální membráně se váže na proapoptotický protein Bax. V případě, že k této vazbě nedojde se protein Bax stává aktivní a tvoří homo-oligomerní kanál, který umožňuje vtok iontů do mitochondrií a je tak započata aktivace apoptotického procesu. Proto nevyvážená exprese těchto proteinů by mohla vést k indukci apoptosy (Sinha Hikim and Swerdloff, 1999).

U skupin s detekovaným zvýšeným počtem apoptotických buněk byla také detekována signifikantně snížená exprese genu pro protein Hsp60 a to jak na úrovni mRNA (Obr.19) tak na úrovni proteinu (Obr.25). Hsp60 je mitochondriální protein, který slouží jako chaperon nově importovaných proteinů a také pomáhá transportovat proteiny z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru. Funkce Hsp60 je nezbytná pro správnou funkci mitochondrií (Meinhardt et al., 1995; Werner et al., 1997).

Z našich výsledků se dá usuzovat, že u skupin T z F1 generace a skupin TK a TT z F2 generace došlo ke zvýšenému výskytu apoptotického procesu

v testikulárních buňkách v důsledku poškození či nesprávné funkce mitochondrií. Tato hypotéza je podpořena výsledky Ogunbayo et al. (2008), kteří prokázali, že TBBPA způsobuje dramatické změny v mitochondriálním membránovém potenciálu a následnou smrt u TM4 Sertoliho buněk *in vitro*. Je pravděpodobné, že změny v mitochondriálním membránovém potenciálu indukují uvolnění různých pro-apoptotických faktorů a následnou buněčnou smrt u těchto buněk *in vitro* (Hom et al., 2007).

U skupiny KT F2 generace nebyl zaznamenán zvýšený počet apoptotických buněk v testes ani nebyla změněna exprese genů pro Bcl-2 a Bax, ale byla zaznamenána snížená exprese genu pro protein HSP60 (Obr.19). Exprese byla snížena méně než u skupin T, TK a TT a vzhledem k tomu, že exprese genů pro Bax a Bcl-2 byla neměnná (Obr.21, 22) a ani počet apoptotických buněk v testes zvýšen nebyl (Tabulka 6), dá se předpokládat, že u této skupiny nedošlo k vážnějšímu poškození mitochondrií.

Dále byla zaznamenána snížená exprese u genu pro Hsp70-2 a to u všech experimentálních skupin z F1 i F2 generace (Obr.18). Tento náález byl potvrzen i na úrovni proteinu, kdy u experimentálních skupin bylo detekováno menší množství proteinu Hsp70-2 než-li u kontrolních skupin (Obr.23). Hsp70-2 je exprimován během meiotické fáze spermatogeneze a to hlavně u pachyténích spermatocytů (Feng et al., 2001). Bylo prokázáno, že nedostatečná exprese tohoto genu zapříčiňuje přerušení spermatogeneze a smrt meiotických spermatogenních buněk (Dix et al., 1997). Skupina Widlack et al. (2007) prokázala, že při konstitutivní expresi aktivního HSF1 dochází k indukci kaspasy-3 -dependentní apoptose a mimo jiné i k downregulaci Hsp70-2. HSF1 je primární transkripční faktor zodpovědný za odpověď na různé formy buněčného stresu (Baler et al., 1993), jeho konstitutivní exprese tak simuluje vystavení buňky permanentnímu stresu. Z uvedeného vyplývá, že u experimentálních myší mohlo dojít k zvýšenému stresu spermatogenních buněk a tím ke snížené expresi Hsp70-2, která následně mohla také přispět ke zvýšenému počtu apoptotických buněk v testes experimentálních zvířat.

Dalším heat shock proteinem jehož exprese byla detekována byl Apg-1. Tento protein nalezneme ve všech typech spermatogenních zárodečných buněk (Kaneko et al., 1997a) a bylo prokázáno, že je nezbytný pro správný průběh spermatogeneze (Held et al., 2006). Exprese tohoto genu nebyla signifikantně

změněna u žádné z experimentálních skupin (Obr.17). Lze tedy předpokládat že TBBPA neovlivňuje expresi tohoto genu u CD1 myší.

Dále byla detekována exprese genu pro Hsc70t. Hsc70t, který je exprimován specificky v testes během post-meiotické fáze spermatogeneze s největším výskytem u prodlužujících se spermatid (Eddy, 1999). Předpokládá se, že tento protein hraje roli v produkci energie spermií (Eddy, 2002), ale jeho přesná funkce zatím není známá. Zdá se, že exprese tohoto proteinu je translačně regulována. Největší výskyt tohoto proteinu je u prodlužujících se spermatid, které jsou již transkripčně inaktivní. Pomocí RNA sond bylo prokázáno, že Hsc70t mRNA se vyskytuje a akumuluje v dřívějších stádiích spermatogeneze a to v kulatých spermatidách a následná exprese v prodlužujících se spermatidách je translačně regulována (Tsunekawa et al., 1999). V naší studii u skupin T z F1 generace a TK,TT z F2 generace byla detekována zvýšená exprese genu pro protein Hsc70t na úrovni mRNA (Obr.20), avšak toto zjištění se nepodařilo prokázat na úrovni proteinů, kdy jsme detekovali podobné množství proteinu u všech skupin (Obr.26). Toto by mohlo být zapříčiněno faktem, že exprese Hsc70t je regulována translačně nikoliv transkripčně. Detekovaná zvýšená exprese genu pro Hsc70t na úrovni mRNA by mohla být způsobená zvýšeným stresem způsobeným účinky TBBPA. Pokud se buňky byly schopny s tímto stresem vyrovnat během svého postmeiotického období, které již není tak kritické, je možné, že v prodlužujících se spermatidách již nebylo zapotřebí zvýšené množství Hsc70t a nedošlo tak ke zvýšené translaci tohoto proteinu. Další vysvětlení by mohlo spočívat ve snížené senzitivě proteinové analýzy (Western blot), která možná nebyla dostatečně citlivá, aby mohla odhalit rozdíly v množství detekovaného proteinu.

Dalšími geny, u kterých byla detekována míra exprese, byly geny pro proacrosin (Acr) a gen pro androgenní receptor (Ar). Proacrosin je jedním z hlavních akrosomálních proteinů, který se stává aktivní při akrosomální reakci a váže se ke glykoproteinům zona pellucida vajíčka (Peknicova et al., 2001). Tento gen byl vybrán, jako marker poškození akrosomu na úrovni exprese mRNA. Exprese tohoto genu byla srovnatelná u všech skupin v obou generacích (Obr.15). Ani data získaná z imunocytochemie za použití specifických protilátek proti akrosomálním proteinům (Hs-4 a Hs-8) neodhalila žádné poškození akrosomu (Tabulka 5). Lze tedy předpokládat, že TBBPA nemá negativní vliv na vývoj a funkci akrosomu u spermií.

Dále byla zaznamenána snížená exprese genu pro androgení receptor (Ar) u experimentálních skupin z F2 generace (skupiny TK a TT) (Obr.16). Ar je jaderný receptor, který se stává aktivním po navázání ligandu (přirozeně – testosteron či dihydrotestosteron). Po aktivaci působí AR v jádře jako transkripční faktor, který aktivuje transkripci androgen-dependentních genů. Snížená exprese genu pro AR byla také zaznamenána u CD1 myší po podání antiandrogenu vindaololu (Elzeinova et al., 2008) či u krys, kterým byl podáván flutamide (antiandrogenní lék podávaný při léčbě rakoviny), (Kubota et al., 2003). Z uvedeného se dá předpokládat, že TBBPA by mohl mít i slabý antiandrogení účinek, který se projevil až v druhé generaci experimentálních zvířat.

Z našich výsledků se dá usuzovat, že TBBPA nemá přímý vliv na fertilitu či kvalitu spermií CD1 myší, je však schopen ovlivnit genovou expresi vybraných genů v testikulární tkáni. Tyto geny byly vybrány proto, že mají nezastupitelnou roli během spermatogeneze a změna v jejich expresi může negativně ovlivnit průběh tohoto procesu. Změna v expresi námi detekovaných genů pravděpodobně zapříčinila zvýšené množství apoptotických buněk v testikulární tkáni experimentálních zvířat. Není možné ohodnotit, zda tento jev ovlivnil koncentraci spermií, protože námi získaná data nebyla reprodukovatelná.

Skupiny, u kterých byl zaznamenán největší vliv TBBPA na měřené parametry, byly skupina TT z F1 generace a skupina TT z F2 generace. U skupiny TT byla navíc ovlivněna i váha reprodukčních orgánů, dalo by se tedy předpokládat, že v průběhu naší studie nedošlo u experimentálních myší k adaptaci na TBBPA a naopak došlo k lehkému zesílení efektu u skupiny TT. U skupiny TK jsme také detekovali změnu v expresi vybraných genů a navýšení apoptotického procesu v testes. Ovšem u této skupiny byl pozorován menší efekt TBBPA než u skupiny TT. Lze tak předpokládat, že určitý vliv na potomstvo má i fakt zda-li byl otec vystaven v průběhu života vlivu TBBPA či nikoliv. Tuto hypotézu podporuje i fakt, že určité změny v genové expresi byly zaznamenány i u skupiny KT, u které byl vystaven pouze otec.

Jako dodatková studie byla provedena další *in vivo* studie, tentokrát na inbredním kmenu myší C57BL/6 (BL/6). Outbrední kmen CD1 myší s vysokou heterozygositou dobře imituje situaci v lidské populaci, ale interpretace získaných dat bývá obtížnější, speciálně v případě genetické analýzy, protože získaná data mohou být ovlivněna právě genetickou rozdílností. Proto jsme se rozhodli provést

dodatkovou studií na inbredním kmenu myši a prověřit tak data získaná z předchozí studie. Tato *in vivo* studie byla jednogenerační a experimentální myši byly ovlivňovány během 30. – 45 dnu, to znamená v období puberty (kritické období). TBBPA byl podáván perorálně rozpuštěný ve vodě v koncentraci 200µg/l a myši byly chovány za stejných podmínek jako tomu bylo v předchozí *in vivo* studii. V této studii jsme se zaměřili na hodnocení parametrů, které jsme zaznamenali jako ovlivněné v předchozí *in vivo* studii. To znamená váha reprodukčních orgánů, apoptotický stav testikulárních buněk a změna exprese genů kódujících vybrané proteiny.

Stejně jako u CD1 tak i u BL/6 myši nebyla zaznamenána změna v anogenitální vzdálenosti ani váze těla po ovlivnění látkou TBBPA. Z měřených reprodukčních orgánů jsme zaznamenali zvýšenou hmotnost u semenných vaků. Avšak váha ostatních reprodukčních orgánů změněna nebyla a navíc v naměřených hodnotách byly zaznamenány poměrně značné rozptyly (Tabulka 7).

Na průtokovém cytometru byl zjištěn zvýšený počet apoptotických buněk v testikulární buněčné suspenzi pocházející z testes experimentální skupiny zvířat. Toto zjištění je v souladu s daty získanými z předchozí studie, kdy byl také zjištěn zvýšený počet apoptotických buněk v testes experimentálních skupin.

V této studii byl k analýze použit průtokový cytometr a bylo tak možné ohodnotit podstatně větší množství buněk a navíc bylo možné rozeznat od sebe jednotlivá buněčná stadia – tetraploidní, diploidní a haploidní stadium. Data získaná pomocí průtokové cytometrie ukázala, že zvýšený počet apoptotických buněk v testes experimentální skupiny zvířat se je způsoben především zvýšeným výskytem apoptotického procesu u populace diploidních buněk (Sertoliho a Leydigovi buňky, spermatogonie), (Tabulka 8). U experimentální skupiny zvířat byla také zjištěna signifikantně zvýšená exprese genu pro proapoptotický protein Bax (Obr.39) a snížená exprese genu pro antiapoptotický protein Bcl-2 (Obr.38). Rovněž byla zaznamenána snížená exprese genu pro mitochondriální chaperon – Hsp60 (Obr.36). Tato zjištění jsou v souladu s výsledky, které jsme obdrželi z CD1 *in vivo* pokusu. Studie na inbrední linii BL/6 myši *in vivo* prokázala vliv TBBPA na apoptotický stav testikulárních buněk. Vzhledem k tomu, že byla opět detekována snížená exprese mitochondriálního chaperonu Hsp60 u myši ovlivněných látkou TBBPA, lze usuzovat, že zvýšené množství apoptotických buněk bylo způsobeno poškozením či nesprávnou funkcí mitochondrií. Navíc data z průtokové cytometrie

ukázala, že největší nárůst apoptotického procesu byl v diploidní populaci buněk, které exprimují Hsp60. Do diploidní populace buněk patří i Sertoliho buňky, i kterých byl prokázán negativní vliv TBBPA *in vitro*, který se projevil dramatickými změnami na mitochondriální membráně a následnou smrtí těchto buněk (Ogunbayo et al., 2008). Sertoliho buňky chrání a vyživují spermatické buňky, proto jejich snížený počet by mohl mít vliv na kvalitu a množství zralých spermií.

V procesu aktivace apoptotického procesu hraje klíčovou roli aktivace tzv. exekučních kaspas. Jednou z hlavních exekučních kaspas je kaspasa 3, proto jsme měřili aktivitu tohoto enzymu v testes experimentálních a kontrolních zvířat. U myší ovlivněných látkou TBBPA by navýšena aktivita tohoto enzymu o 25% v porovnání s kontrolními zvířaty (Obr.31). Tento výsledek potvrdil, že v testes ovlivněných zvířat dochází k nárůstu apoptotického procesu. Dále bylo pomocí statistické analýzy zjištěno, že míra aktivity enzymu kaspasy 3 negativně koreluje s expresí genu pro antiapoptotický protein Bcl-2 (Obr.40) a naopak pozitivně koreluje s expresí genu pro proapoptotický protein Bax (Obr.41). Tato data jsou tedy v souladu s faktem, že nadbytek proapoptotického proteinu aktivuje signální kaskádu vedoucí k aktivaci exekuční kaspasy 3 (Sinha Hikim and Swerdloff, 1999).

U skupiny zvířat ovlivněných látkou TBBPA byla také detekována snížená exprese genu pro Hsp70-2 (Obr.35). Toto zjištění je rovněž v souladu s výsledky získanými z CD1 *in vivo* studie. Vzhledem k tomu, že nedostatečná exprese genu pro Hsp70-2 zapříčiňuje přerušení spermatogeneze a smrt meiotických spermatogenních buněk (Dix et al., 1997), dá se předpokládat, že snížená exprese tohoto genu by mohla také přispět k zvýšenému výskytu apoptotických buněk v testes u zvířat ze skupiny skupině TBBPA.

Expresí genu pro Hsc70t se u experimentálních zvířat nelišila oproti kontrole (Obr.37). U CD1 myší byla zaznamenána naopak zvýšená exprese tohoto genu u myší ovlivněných TBBPA (Obr.20) byla detekována u genu pro heat shock protein Hsc70-t. Avšak nepodařilo se prokázat změnu exprese na úrovni proteinu (Obr.27).

U myší ze skupiny TBBPA byla také detekována zvýšená exprese genu pro heat shock protein Apg-1 (Obr.34). Tento výsledek se neshoduje s daty získanými z CD1 *in vivo* studie, kde nebyla zaznamenána změna v expresi tohoto genu (Obr.17). Heat shock protein Apg-1 se vyskytuje ve všech typech spermatogenních zárodečných buněk (Kaneko et al., 1997a) a bylo prokázáno, že je nezbytný pro správný průběh spermatogeneze (Held et al., 2006). Gen pro Apg-1 je konstitutivně

exprimován, jeho exprese však může být indukována i stresovými podmínkami (Kaneko et al., 1997b). Proto se lze domnívat, že zvýšená exprese tohoto genu u experimentální skupiny zvířat byla způsobena stresovými podmínkami vzniklými v důsledku působení TBBPA.

BL/6 *in vivo* studie potvrdila, že látka TBBPA je schopna ovlivnit expresi vybraných genů a také vyvolat zvýšenou incidenci apoptotického procesu v testech experimentálních zvířat. Zvýšený výskyt apoptosy byl potvrzen na několika úrovních (poškození DNA, genová exprese, aktivita enzymu kaspasy-3). Navíc v obou studiích byla prokázána snížená exprese genů pro Hsp70-2 a Hsp60. Tento fakt by také mohl přispět k zvýšenému výskytu apoptosy v testech experimentálních zvířat neboť bylo prokázáno, že nedostatečná exprese těchto genů vede k poškození testikulárních buněk a následně k apoptotické smrti (Dix et al., 1997; Werner et al., 1997).

Gen pro androgení receptor (Ar) nebyl ovlivněn u experimentálních zvířat v BL/6 (Obr.33) *in vivo* studii ani u experimentálních zvířat F1 generace v CD1 *in vivo* studii. Ke změně v jeho expresi došlo až v F2 generaci a to u skupin TK a TT (Obr.16). Dalo by se tedy předpokládat, že TBBPA by mohl mít slabý antiandrogení účinek, který se projevil až v druhé generaci experimentálních zvířat vystavených účinkům TBBPA. Tuto hypotézu podporuje i fakt že u krys, které byly ovlivňovány látkou TBBPA byla ovlivněna cirkulace testosteronu v krvi samců, což také naznačuje možný antiandrogenní účinek TBBPA (Van der Ven et al., 2008). Dále se dá usuzovat, že by se efekt TBBPA mohl přenášet mezi generacemi a docházet tak k jeho kumulaci při kontinuální expozici. Tuto hypotézu podporuje i fakt, že pouze u skupiny TT z F2 generace došlo k ovlivnění hmotnosti reprodukčních orgánů.

Expresi genu pro preacrosin (Acr) nebyla změněna ani v jedné z našich *in vivo* studií. Lze tedy předpokládat, že TBBPA nemá vliv na expresi tohoto acrosomálního proteinu.

U genů kódujících proteiny Hsc70t a Apg-1 se výsledky získané z BL/6 *in vivo* studie neshodovaly s výsledky získanými z CD1 *in vivo* studie. Tato rozdílnost může být způsobena genetickými rozdíly v daných myších kmenech. Navíc u genu pro Hsc70t, kde byla detekována zvýšená exprese tohoto genu u experimentálních zvířat, nebyla tato změna exprese detekována na úrovni proteinu. Je tedy pravděpodobné, že množství proteinu zůstalo neměnné v obou případech.

Z porovnání BL/6 a CD1 *in vivo studií* vyplývá, že TBBPA způsobuje zvýšený výskyt apoptotického procesu v testes experimentálních zvířat a také je schopen ovlivnit expresi genů důležitých pro správný průběh spermatogeneze. Zdá se tedy, že TBBPA je schopen negativně ovlivnit proces spermatogeneze, avšak bez toho aby se to projevilo na fertilitě ovlivněných jedinců. Z analýzy na průtokovém cytometru vyplývá, že největší negativní dopad má TBBPA na diploidní populaci testikulárních buněk, kam patří i Sertoliho buňky, které chrání a vyživují vyvíjející se spermie. Jejich snížený počet by tak mohl mít vliv na koncentraci a kvalitu zralých spermií. Tento jev se nám ovšem nepodařilo prokázat.

6 Závěr

TBBPA je schopen negativně ovlivnit proces spermatogeneze a to na úrovni genové exprese a apoptosy. Tento negativní vliv se však signifikantně neprojevil na fertilitě ovlivňovaných zvířat. Experimentální zvířata byla udržována v ideálních podmínkách, kde na ně nepůsobily žádné další negativní vlivy prostředí. Proto negativní vliv být jen na úrovni spermatogeneze ukazuje, že TBBPA by mohl být jednou z látek, jejíž negativní vliv přispívá k zhoršení kvality spermatu a nárůstu problémům v oblasti reprodukce v posledních desetiletích.

Z dvougenerační CD1 *in vivo* studie lze usuzovat, že v případě permanentní expozice touto látkou dochází k lehké akumulaci jejího účinku a dochází i k částečnému parentálnímu přenosu účinků TBBPA. Tento mezigenerační přenos by byl možný přes epigenetické mechanismy. Tato hypotéza vyžaduje další analýzu, aby bylo možné určit zda-li a případně jakými mechanismy k epigenetickému přenosu dochází (analýza DNA methylace, histonové postranslační modifikace, microRNA-exprese).

7 Literatura

- Aitken, R.J., B. Nixon, M. Lin, A.J. Koppers, Y.H. Lee, and M.A. Baker. 2007. Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian J Androl.* 9:554-564.
- Alaee, M., P. Arias, A. Sjodin, and A. Bergman. 2003. An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environ Int.* 29:683-689.
- Allan, D.J., B.V. Harmon, and S.A. Roberts. 1992. Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. *Cell Prolif.* 25:241-250.
- Allen, J.W., D.J. Dix, B.W. Collins, B.A. Merrick, C. He, J.K. Selkirk, P. Poorman-Allen, M.E. Dresser, and E.M. Eddy. 1996. HSP70-2 is part of the synaptonemal complex in mouse and hamster spermatocytes. *Chromosoma.* 104:414-421.
- Baldi, E., M. Luconi, L. Bonaccorsi, C. Krausz, and G. Forti. 1996. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Front Biosci.* 1:d189-205.
- Baler, R., G. Dahl, and R. Voellmy. 1993. Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1. *Mol Cell Biol.* 13:2486-2496.
- Birnbaum, L.S., and D.F. Staskal. 2004. Brominated flame retardants: cause for concern? *Environ Health Perspect.* 112:9-17.
- Breitbart, H., G. Cohen, and S. Rubinstein. 2005. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction.* 129:263-268.
- Clouthier, D.E., M.R. Avarbock, S.D. Maika, R.E. Hammer, and R.L. Brinster. 1996. Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature.* 381:418-421.
- Colborn, T., F.S. vom Saal, and A.M. Soto. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect.* 101:378-384.
- De Jonge, C. 2005. Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update.* 11:205-214.

- de Vanterry Arrighi, C., H. Lucas, D. Chardonnes, and A. de Agostini. 2009. Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reprod Biol Endocrinol*. 7:1.
- de Wit, C.A. 2002. An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere*. 46:583-624.
- Dix, D.J., J.W. Allen, B.W. Collins, C. Mori, N. Nakamura, P. Poorman-Allen, E.H. Goulding, and E.M. Eddy. 1996. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:3264-3268.
- Dix, D.J., J.W. Allen, B.W. Collins, P. Poorman-Allen, C. Mori, D.R. Blizard, P.R. Brown, E.H. Goulding, B.D. Strong, and E.M. Eddy. 1997. HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Development*. 124:4595-4603.
- Ducibella, T. 1996. The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Hum Reprod Update*. 2:29-42.
- Dunphy, W.G., L. Brizuela, D. Beach, and J. Newport. 1988. The *Xenopus cdc2* protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell*. 54:423-431.
- Eddy, E.M. 1999. Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod*. 4:23-30.
- Eddy, E.M. 2002. Male germ cell gene expression. *Recent Prog Horm Res*. 57:103-128.
- El-Dakdoky, M.H., and M.A. Helal. 2007. Reproductive toxicity of male mice after exposure to nonylphenol. *Bull Environ Contam Toxicol*. 79:188-191.
- Elzeinova, F., V. Novakova, D. Buckiova, A. Kubatova, and J. Peknicova. 2008. Effect of low dose of vinclozolin on reproductive tract development and sperm parameters in CD1 outbred mice. *Reprod Toxicol*. 26:231-238.
- Feng, H.L., J.I. Sandlow, and A.E. Sparks. 2001. Decreased expression of the heat shock protein hsp70-2 is associated with the pathogenesis of male infertility. *Fertil Steril*. 76:1136-1139.
- Fini, J.B., S. Le Mevel, N. Turque, K. Palmier, D. Zalko, J.P. Cravedi, and B.A. Demeneix. 2007. An in vivo multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. *Environ Sci Technol*. 41:5908-5914.

- Francavilla, S., P. D'Abrizio, N. Rucci, G. Silvano, G. Properzi, E. Straface, G. Cordeschi, S. Necozone, L. Gnessi, M. Arizzi, and S. Ulisse. 2000. Fas and Fas ligand expression in fetal and adult human testis with normal or deranged spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 85:2692-2700.
- Gilbert, S., F. V knize: Developmental biology, 6TH edition. 2000. Sinauer Associates.
- Held, T., I. Paprotta, J. Khulan, B. Hemmerlein, L. Binder, S. Wolf, S. Schubert, A. Meinhardt, W. Engel, and I.M. Adham. 2006. Hspa4l-deficient mice display increased incidence of male infertility and hydronephrosis development. *Mol Cell Biol.* 26:8099-8108.
- Hellwig, J., B. van Ravenzwaay, M. Mayer, and C. Gembardt. 2000. Pre- and postnatal oral toxicity of vinclozolin in Wistar and Long-Evans rats. *Regul Toxicol Pharmacol.* 32:42-50.
- Hom, J.R., J.S. Gewandter, L. Michael, S.S. Sheu, and Y. Yoon. 2007. Thapsigargin induces biphasic fragmentation of mitochondria through calcium-mediated mitochondrial fission and apoptosis. *J Cell Physiol.* 212:498-508.
- Chen, L., S.E. Wert, E.M. Hendrix, P.T. Russell, M. Cannon, and W.J. Larsen. 1990. Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass. *Mol Reprod Dev.* 26:236-247.
- Jacobson, M.D., M. Weil, and M.C. Raff. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell.* 88:347-354.
- Jakobsson, K., K. Thuresson, L. Rylander, A. Sjodin, L. Hagmar, and A. Bergman. 2002. Exposure to polybrominated diphenyl ethers and tetrabromobisphenol A among computer technicians. *Chemosphere.* 46:709-716.
- Jonakova, V., P. Manaskova, M. Kraus, J. Liberda, and M. Ticha. 2000. Sperm surface proteins in mammalian fertilization. *Mol Reprod Dev.* 56:275-277.
- Juncquiera, L., C. Carniero, L. Kelley and R.O. Kelley. 1992. V Knize: Základy histologie. Nakladatelství a vydavatelství H&H.
- Kaneko, Y., T. Kimura, H. Nishiyama, Y. Noda, and J. Fujita. 1997a. Developmentally regulated expression of APG-1, a member of heat shock protein 110 family in murine male germ cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 233:113-116.

- Kaneko, Y., H. Nishiyama, K. Nonoguchi, H. Higashitsuji, M. Kishishita, and J. Fujita. 1997b. A novel hsp110-related gene, *apg-1*, that is abundantly expressed in the testis responds to a low temperature heat shock rather than the traditional elevated temperatures. *J Biol Chem.* 272:2640-2645.
- Kierszenbaum, A.L., E. Rivkin, and L.L. Tres. 2007. Molecular biology of sperm head shaping. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 65:33-43.
- Kitamura, S., N. Jinno, S. Ohta, H. Kuroki, and N. Fujimoto. 2002. Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun.* 293:554-559.
- Korner, W., V. Hanf, W. Schuller, H. Bartsch, M. Zwirner, and H. Hagenmaier. 1998. Validation and application of a rapid in vitro assay for assessing the estrogenic potency of halogenated phenolic chemicals. *Chemosphere.* 37:2395-2407.
- Kyselova, V., J. Peknicova, M. Boubelik, and D. Buckiova. 2004. Body and organ weight, sperm acrosomal status and reproduction after genistein and diethylstilbestrol treatment of CD1 mice in a multigenerational study. *Theriogenology.* 61:1307-1325.
- Kyselova, V., J. Peknicova, D. Buckiova, and M. Boubelik. 2003. Effects of p-nonylphenol and resveratrol on body and organ weight and in vivo fertility of outbred CD-1 mice. *Reprod Biol Endocrinol.* 1:30.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Laemmli, U.K., F. Beguin, and G. Gujer-Kellenberger. 1970. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol.* 47:69-85.
- Lee, H. and E. T. Peart. 2002. Organic contaminants in canadian municipal sewage sludge. Part I. Toxic or endocrine-disrupting phenolic compounds. *Water quality research journal Canada.* 37:681-696.
- Legler, J. 2008. New insights into the endocrine disrupting effects of brominated flame retardants. *Chemosphere.* 73:216-222.
- Lin, M., R. Hess, and R.J. Aitken. 2002. Induction of sperm maturation in vitro in epididymal cell cultures of the tammar wallaby (*Macropus eugenii*): disruption of motility initiation and sperm morphogenesis by inhibition of actin polymerization. *Reproduction.* 124:107-117.

- Mamo, S., A.B. Gal, S. Bodo, and A. Dinnyes. 2007. Quantitative evaluation and selection of reference genes in mouse oocytes and embryos cultured in vivo and in vitro. *BMC Dev Biol.* 7:14.
- Manaskova, P., H. Rylava, M. Ticha, and V. Jonakova. 2002. Characterization of proteins from boar prostate. *Am J Reprod Immunol.* 48:283-290.
- Martin, S.J., C.P. Reutelingsperger, A.J. McGahon, J.A. Rader, R.C. van Schie, D.M. LaFace, and D.R. Green. 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 182:1545-1556.
- Meerts, I.A., J.J. van Zanden, E.A. Luijckx, I. van Leeuwen-Bol, G. Marsh, E. Jakobsson, A. Bergman, and A. Brouwer. 2000. Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro. *Toxicol Sci.* 56:95-104.
- Meinhardt, A., M. Parvinen, M. Bacher, G. Aumuller, H. Hakovirta, A. Yagi, and J. Seitz. 1995. Expression of mitochondrial heat shock protein 60 in distinct cell types and defined stages of rat seminiferous epithelium. *Biol Reprod.* 52:798-807.
- Meinhardt, A., J. Seitz, M. Arslan, G. Aumuller, and G.F. Weinbauer. 1998. Hormonal regulation and germ cell-specific expression of heat shock protein 60 (hsp60) in the testis of macaque monkeys (*Macaca mulatta* and *M. fascicularis*). *Int J Androl.* 21:301-307.
- Moreno-Fierros, L., E.O. Hernandez, Z.O. Salgado, and A. Mujica. 1992. F-actin in guinea pig spermatozoa: its role in calmodulin translocation during acrosome reaction. *Mol Reprod Dev.* 33:172-181.
- Neuer, A., S.D. Spandorfer, P. Giraldo, J. Jeremias, S. Dieterle, I. Korneeva, H.C. Liu, Z. Rosenwaks, and S.S. Witkin. 1999. Heat shock protein expression during gametogenesis and embryogenesis. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 7:10-16.
- Newbold, R.R., W.N. Jefferson, and E. Padilla-Banks. 2007. Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol A on the murine female reproductive tract. *Reprod Toxicol.* 24:253-258.

- Ogunbayo, O.A., P.F. Lai, T.J. Connolly, and F. Michelangeli. 2008. Tetrabromobisphenol A (TBBPA), induces cell death in TM4 Sertoli cells by modulating Ca²⁺ transport proteins and causing dysregulation of Ca²⁺ homeostasis. *Toxicol In Vitro*. 22:943-952.
- Ochs, D., and D.P. Wolf. 1985. Actin in ejaculated human sperm cells. *Biol Reprod*. 33:1223-1226.
- Oldereid, N.B., P.D. Angelis, R. Wiger, and O.P. Clausen. 2001. Expression of Bcl-2 family proteins and spontaneous apoptosis in normal human testis. *Mol Hum Reprod*. 7:403-408.
- Peknicova, J., J. Capkova, G. Geussova, M. Ivanova, and M. Mollova. 2001. Monoclonal antibodies to intra-acrosomal proteins inhibit gamete binding in vitro. *Theriogenology*. 56:211-223.
- Peknicova, J., D. Chladek, and P. Hozak. 2005. Monoclonal antibodies against sperm intra-acrosomal antigens as markers for male infertility diagnostics and estimation of spermatogenesis. *Am J Reprod Immunol*. 53:42-49.
- Peknicova, J., V. Kyselova, D. Buckiova, and M. Boubelik. 2002. Effect of an endocrine disruptor on mammalian fertility. Application of monoclonal antibodies against sperm proteins as markers for testing sperm damage. *Am J Reprod Immunol*. 47:311-318.
- Pentikainen, V., K. Erkkila, and L. Dunkel. 1999. Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am J Physiol*. 276:E310-316.
- Porter, A.G. 2006. Flipping the safety catch of procaspase-3. *Nat Chem Biol*. 2:509-510.
- Reistad, T., E. Mariussen, A. Ring, and F. Fonnum. 2007. In vitro toxicity of tetrabromobisphenol-A on cerebellar granule cells: cell death, free radical formation, calcium influx and extracellular glutamate. *Toxicol Sci*. 96:268-278.
- Ren, S., F. Zhang, C. Li, C. Jia, S. Li, H. Xi, H. Zhang, L. Yang, and Y. Wang. 2010. Selection of housekeeping genes for use in quantitative reverse transcription PCR assays on the murine cornea. *Mol Vis*. 16:1076-1086.
- Rogers, B.J., C. Bastias, R.L. Coulson, and L.D. Russell. 1989. Cytochalasin D inhibits penetration of hamster eggs by guinea pig and human spermatozoa. *J Androl*. 10:275-282.

- Samuelsen, M., C. Olsen, J.A. Holme, E. Meussen-Elholm, A. Bergmann, and J.K. Hongslo. 2001. Estrogen-like properties of brominated analogs of bisphenol A in the MCF-7 human breast cancer cell line. *Cell Biol Toxicol.* 17:139-151.
- Segev, O., A. Kushmaro, and A. Brenner. 2009. Environmental impact of flame retardants (persistence and biodegradability). *Int J Environ Res Public Health.* 6:478-491.
- Sellstrom, U., and B. Jansson. 1995. Analysis of Tetrabromobisphenol a in a Product and Environmental-Samples. *Chemosphere.* 31:3085-3092.
- Schlesinger, M.J. 1990. Heat shock proteins. *J Biol Chem.* 265:12111-12114.
- Sinha Hikim, A.P., and R.S. Swerdloff. 1999. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod.* 4:38-47.
- Sjodin, A., D.G. Patterson, Jr., and A. Bergman. 2003. A review on human exposure to brominated flame retardants--particularly polybrominated diphenyl ethers. *Environ Int.* 29:829-839.
- Spungin, B., I. Margalit, and H. Breitbart. 1995. Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *J Cell Sci.* 108 (Pt 6):2525-2535.
- Strack, S., T. Detzel, M. Wahl, B. Kuch, and H.F. Krug. 2007. Cytotoxicity of TBBPA and effects on proliferation, cell cycle and MAPK pathways in mammalian cells. *Chemosphere.* 67:S405-411.
- Takigami, H., G. Suzuki, Y. Hirai, and S. Sakai. 2008. Transfer of brominated flame retardants from components into dust inside television cabinets. *Chemosphere.* 73:161-169.
- Tesarik, J., J. Drahorad, J. Testart, and C. Mendoza. 1990. Acrosin activation follows its surface exposure and precedes membrane fusion in human sperm acrosome reaction. *Development.* 110:391-400.
- Van der Ven, L.T., T. Van de Kuil, A. Verhoef, C.M. Verwer, H. Lilienthal, P.E. Leonards, U.M. Schauer, R.F. Canton, S. Litens, F.H. De Jong, T.J. Visser, W. Dekant, N. Stern, H. Hakansson, W. Slob, M. Van den Berg, J.G. Vos, and A.H. Piersma. 2008. Endocrine effects of tetrabromobisphenol-A (TBBPA) in Wistar rats as tested in a one-generation reproduction study and a subacute toxicity study. *Toxicology.* 245:76-89.

- Virtanen, I., R.A. Badley, R. Paasivuo, and V.P. Lehto. 1984. Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells. *J Cell Biol.* 99:1083-1091.
- Watanabe, I., T. Kashimoto, and R. Tatsukawa. 1983. Identification of the flame retardant tetrabromobisphenol-A in the river sediment and the mussel collected in Osaka. *Bull Environ Contam Toxicol.* 31:48-52.
- Werner, A., A. Meinhardt, J. Seitz, and M. Bergmann. 1997. Distribution of heat-shock protein 60 immunoreactivity in testes of infertile men. *Cell Tissue Res.* 288:539-544.
- World Health Organization (WHO). 2010. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edition, Geneva, Switzerland. (ISBN 978 92 4 154778 9)
- Widlak, W., N. Vydra, E. Malusecka, V. Dudaladava, B. Winiarski, D. Scieglinska, and P. Widlak. 2007. Heat shock transcription factor 1 down-regulates spermatocyte-specific 70 kDa heat shock protein expression prior to the induction of apoptosis in mouse testes. *Genes Cells.* 12:487-499.
- Yanagimachi, R. Knobil, E. and E.D. Neil. V knize: The physiology of reproduction, vol. 1, 2nd edition. Raven Press, Ltd., New York.
- Yu, W.J., B.J. Lee, S.Y. Nam, B. Ahn, J.T. Hong, J.C. Do, Y.C. Kim, Y.S. Lee, and Y.W. Yun. 2004. Reproductive disorders in pubertal and adult phase of the male rats exposed to vinclozolin during puberty. *J Vet Med Sci.* 66:847-853.
- Zhu, D., D.J. Dix, and E.M. Eddy. 1997. HSP70-2 is required for CDC2 kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes. *Development.* 124:3007-3014.